

Radikalsonden zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in vitalen Zellen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Diana Kobus
aus Bochum

Essen 2006

Referent:	Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Mathias Ulbricht
Tag der Disputation:	19. Dezember 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2004 bis Dezember 2006 im Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen sowie im Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen angefertigt. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Reiner Sustmann

für die Überlassung des interessanten Themas, die mir stets gewährte Unterstützung und die wertvollen Ratschläge während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates, für die anregenden Diskussionsbeiträge und das Einverständnis zur Durchführung zahlreicher Experimente am Institut für Physiologische Chemie.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Institutes für Organische Chemie für die Kollegialität und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Frau Elisabeth Verheggen und Frau Pia Mereu für ihre hervorragende Mitarbeit sowie Herrn Dr. Hans-Gert Korth für die stets gewährte Hilfe und Diskussionsbereitschaft.

Dank aussprechen möchte ich auch allen Mitgliedern des Institutes für Physiologische Chemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Kooperation. Sehr herzlich danken möchte ich vor allem Frau Priv.-Doz. Dr. Ursula Rauen für die intensive Betreuung im Rahmen der Arbeiten am Institut für Physiologische Chemie. Frau Birgit Lammers und Frau Natalie Boschenkov möchte ich für die Bereitstellung der benötigten Zellen danken.

Danken möchte ich zudem den Herren Heinz Bandmann und Thorsten Schaller für die Anfertigung der NMR-Spektren, Herrn Werner Karow für die Erstellung der Massenspektren sowie Herrn Willi Sicking für die Durchführung der Molecular-Modelling-Rechnungen.

Der WASAG-Stiftung für Studiumsförderung möchte ich für die Gewährung eines Stipendiums danken.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Mark Kobus und meinen Eltern Annegret und Hans-Joachim Rolski, die durch ihr Verständnis und ihre Hilfsbereitschaft den Fortgang dieser Arbeit unterstützten.

Inhalt

1	Verzeichnis der Akronyme.....	2
2	Einleitung	4
2.1	Reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen.....	6
2.2	Detektion von Radikalen.....	9
2.2.1	Radikalfänger: Nitroxide, Nitrone und Nitrosoverbindungen	11
2.3	Fluoreszenzspektroskopische Methoden zur Bestimmung von Radikalen	14
2.3.1	Der Prozess der Fluoreszenz.....	14
2.3.2	Fluoreszenzspektroskopie	16
2.3.3	Fluoreszenzerniedrigung und Fluoreszenzlöschung	17
2.3.4	Prinzip der Fluoreszenzspektroskopischen Bestimmungsmethode in biologischen Systemen	24
2.3.5	Bekannte Fluoreszenz-Radikalsonden zur Detektion von Radikalen in biologischen Systemen.....	25
3	Problemstellung	26
4	Entwicklung und Untersuchung von Fluoreszenzsonden zum Nachweis von Radikalen	28
4.1	Aufbau der Radikalsonden	28
4.1.1	Die Fängerfunktion.....	28
4.1.2	Die Fluoreszenzgebende Komponente	30
4.2	Darstellung der Fluoreszenzsonden zum Nachweis von Radikalen	33
4.3	Untersuchung der potentiellen Fluoreszenzsonden im chemischen System	51
4.3.1	Phenantridin-5-oxid (6).....	51
4.3.1.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	51
4.3.2	Fluorenyl-(α -fluorenyl)-amin-N-oxid (10)	53
4.3.2.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	53
4.3.2.2	UV/Vis-spektroskopische Untersuchung	54
4.3.3	N-tert.-Butyl- α -phenylnitron (13).....	56
4.3.3.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	56
4.3.3.2	UV/Vis-spektroskopische Untersuchung	58
4.3.4	N, α -Diphenylnitron (15).....	59

4.3.4.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	59
4.3.4.2	UV/Vis-spektroskopische Untersuchung	59
4.3.5	tert.-Butylnitrono-rhodamin B (23).....	62
4.3.5.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	62
4.3.5.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	65
4.3.6	4,4-Difluoro-8-[4-(phenylnitrono)phenyl]1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (38)	68
4.3.6.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	68
4.3.6.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	72
4.3.7	4,4-Difluoro-8-[4-(4-nitrophenylnitrono)phenyl]1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (39)	74
4.3.7.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	74
4.3.7.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	76
4.3.8	4,4-Difluoro-8-[4-(2,4-dinitrophenylnitrono)phenyl]1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (41)	78
4.3.8.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	78
4.3.8.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	80
4.3.8.3	Untersuchung der Reduktionsempfindlichkeit.....	83
4.3.9	4,4-Difluoro-8-(4-phenylnitrono-rhodamin B)-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (43)	87
4.3.9.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	87
4.3.9.2	UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	91
4.3.10	4,4-Difluoro-8-(4-nitrosophenyl)1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (45).....	98
4.3.10.1	Untersuchung der Eignung als Radikalfänger.....	98
4.3.10.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.....	104
4.3.10.3	Untersuchung der Reduktionsempfindlichkeit.....	108
4.4	Einsatz der Fluoreszenzsonden im zellulären System	111
4.4.1	Ermittlung der zellulären Indikator-Konzentration.....	111
4.4.2	Vitalitätsbestimmung	113
4.4.3	Subzelluläre Verteilung des Farbstoffes.....	117
4.4.4	Untersuchungen zur Eignung als Radikalsonde im zellulären System	118

4.4.4.1	Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch L-Histidin.....	119
4.4.4.2	Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch L-Histidin und Schutz durch Vorinkubation mit Desferal	121
4.4.4.3	Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch Fe(III) / 8-HQ.....	123
4.4.4.4	Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch KCN und Menadion (Hepatozyten).....	124
4.4.4.5	Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch D-Glucose/GOD ($O_2^{\cdot-}$) und D-Glucose/Fe(III)/8-HQ ($\cdot OH$)	125
4.4.4.6	Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch KCN, <i>tert.</i> -Butylhydroperoxid und Menadion (Fibroblasten)	127
4.4.5	Lipidperoxidation (MDA-Test).....	129
5	Zusammenfassung.....	132
6	Ausblick	136
7	Experimenteller Teil	138
7.1	Instrumentelle Analytik	138
7.2	Materialien zur Synthese und zur Messung im chemischen System	140
7.3	Trocknung der Lösungsmittel	142
7.4	Materialien für biologische Anwendungen	143
7.5	Versuchstiere.....	144
7.6	Synthese der Fluoreszenzindikatoren	145
7.6.1	Phenanthridin-N-oxid (A1) ^[68]	145
7.6.2	2-Hydroxylaminofluoren (8).....	146
7.6.3	Fluorenyl-(α -fluorenyl)-amin-N-oxid (10)	148
7.6.4	N- <i>tert.</i> -Butyl- α -phenylnitron (A8) ^[86]	150
7.6.5	N- <i>tert.</i> -Butyl-N-(1-phenylethyl)hydroxylamin (14) ^[70]	151
7.6.6	N-Phenyl-N-(1-phenylethyl)hydroxylamin (16) ^[70]	152
7.6.7	N-Phenyl-N-(1-phenylethyl)methoxyhydroxylamin	153
7.6.8	Phenylhydroxylamin (18).....	154
7.6.9	Syntheseversuch von N-Phenyl- α - <i>tert.</i> -butylnitron.....	155
7.6.10	Rhodamin B-Alkohol (21)	156
7.6.11	Rhodamin B-Aldehyd (22)	159

7.6.12	<i>tert.</i> -Butylnitrono-rhodamin B (23).....	161
7.6.13	4-Hydroxylaminochinolin (25).....	163
7.6.14	Syntheseversuch von N-(4-Chinolinyl)- α -(9-anthracenyl)-nitron (27).....	165
7.6.14.1	Syntheseversuch bei 20 °C.....	165
7.6.14.2	Syntheseversuch bei 40 °C.....	165
7.6.15	1-Nitropyren (28) ^[89]	166
7.6.16	Syntheseversuch von 1-Hydroxylaminopyren (29).....	167
7.6.16.1	Syntheseversuch a) Reduktionsmittel Zn/HCl ^[74]	167
7.6.16.2	Syntheseversuch b) Reduktionsmittel Hydrazin/Pd.....	168
7.6.16.3	Syntheseversuch c) Reduktionsmittel Hydrazin/Rh.....	168
7.6.16.4	Syntheseversuch d) Reduktionsmittel Ammoniumsulfid.....	169
7.6.17	4,4-Difluoro-8-(4-nitrophenyl)1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4- bora-3a,4a-diaza-s-indacen (36) ^[90]	169
7.6.18	4,4-Difluoro-8-(4-hydroxylaminophenyl)1,3,5,7-tetramethyl-2,6- dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (37).....	172
7.6.19	4,4-Difluoro-8-[4-(phenylnitrono)phenyl]1,3,5,7-tetramethyl-2,6- dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (38).....	175
7.6.20	4,4-Difluoro-8-[4-(4-nitrophenylnitrono)phenyl]1,3,5,7-tetramethyl- 2,6-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (39).....	178
7.6.21	4,4-Difluoro-8-[4-(2,4-dinitrophenylnitrono)phenyl]1,3,5,7- tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (41).....	182
7.6.22	4,4-Difluoro-8-{4-[2,4-dinitrophenyl(N-ethyl- methoxyhydroxylamino) phenyl]}1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl- 4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (42).....	185
7.6.23	4,4-Difluoro-8-(4-phenylnitrono-rhodamin B)-1,3,5,7-tetramethyl- 2,6-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (43).....	188
7.6.24	4,4-Difluoro-8-(4-nitrosophenyl)1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4- bora-3a,4a-diaza-s-indacen (45).....	193
7.6.25	4,4-Difluoro-8-[4-nitroso(<i>N</i> , <i>O</i> -diisobutyronitril)phenyl]1,3,5,7- tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (47).....	196
7.7	Untersuchung der Fluoreszenzsonden im zellfreien System.....	199
7.7.1	ESR-spektroskopische Untersuchungen.....	199
7.7.2	Analyse des Fluoreszenzverhaltens vor und nach Radikalabfang	200

7.7.3	Untersuchung der Reduktionsempfindlichkeit	200
7.8	Untersuchung der Fluoreszenzsonden im zellulären System	201
7.8.1	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	201
7.8.2	Zellpräparation und Zellkultivierung	203
7.8.2.1	Präparation und Kultivierung von Rattenhepatozyten	204
7.8.2.2	Kultivierung der Mausfibroblasten	204
7.8.3	Ermittlung der zellulären Indikatorkonzentration	204
7.8.4	Vitalitätsbestimmung	205
7.8.5	Subzelluläre Verteilung des Farbstoffes	206
7.8.6	Untersuchungen zur Eignung als Radikalsonde im zellulären System	207
7.8.7	Lipidperoxidation (MDA-Test)	208
8	Literatur	210
	Persönliche Daten	214
	Ausbildung	214

1 VERZEICHNIS DER AKRONYME

A	Akzeptor
A(λ)	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
AIBN	Azoisobutyronitril
ATP	Adenosintriphosphat
BDP/BODIPY	verweist auf eine Familie von Farbstoffen basierend auf 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (Schutzmarke der Firma Molecular Probes, Inc.).
D	Donor
DC	Dünnschichtchromatographie
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DTBP	Di- <i>tert.</i> -Butylperoxid
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrospray Ionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
FRET	resonanter Fluoreszenzenergietransfer (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GOD	Glucose-Oxidase
HEPES	2[4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-iperaziny]ethansulfonsäure
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i> (Hanks' gepufferte Salzlösung)
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i> (höchstes besetztes Molekülorbital)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
HQ	Hydroxychinolin
HR-MS	<i>High Resolution mass spectrometry</i> (hochaufgelöste Massenspektrometrie)
KH	Krebs Henseleit Puffer

LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i> (tiefstes unbesetztes Molekülorbital)
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(-phosphat) (reduzierte Form)
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
PBN	N- <i>tert.</i> -Butyl- α -phenylnitron
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Konzentration
ppm	<i>parts per million</i> (Anteil pro 100000)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SOD	Superoxiddismutase
TBA	Thiobarbitursäure
tBOOH	<i>tert.</i> -Butylhydroperoxid
TCA	Trichloressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer (<i>time over flight</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

2 EINLEITUNG

Zur Erhaltung der komplexen Strukturen und biologischen Aktivitäten aller bekannten Lebensformen ist es notwendig, Energie in Form von Licht und Nährsubstraten aufzunehmen und somit Wachstum und Vermehrung zu gewährleisten. Die Energieversorgung der Zellen erfolgt – außer bei photosynthetischen Organismen – durch exergone Redoxreaktionen, die für die Bereitstellung von energiereichen Verbindungen verantwortlich sind. Diese energiereichen Zwischenprodukte dienen zur Übertragung der Energie auf endergone Reaktionen. In der lebenden Zelle werden eine Reihe von Verbindungen mit hoher freier Energie für diese Zwecke benutzt, wobei die größte Bedeutung dem Adenosintriphosphat (ATP) zukommt. Als Reduktionsäquivalente für Biosynthesen oder als Energiequelle können Elektronen dienen, die durch die Oxidation der Nahrung freigesetzt werden. Die Elektronen werden zur oxidativen Bildung von ATP auf einen niedermolekularen Elektronenakzeptor übertragen. Bei aeroben Zellen handelt es sich hierbei um molekularen Sauerstoff.^[1]

Allerdings beinhalten die stark exergonen Umsetzungen des Sauerstoffs mit organischen Verbindungen erhebliche Gefahren für die Zelle. Bei der Reduktion des Sauerstoffs entstehen radikalische Zwischenstufen, deren hohe Reaktivität zur unkontrollierten Oxidation von zellulären Verbindungen mit weitreichenden Folgen führen kann. Die wichtigste Quelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) ist die Ein-Elektronenreduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxid-Radikalanion $O_2^{\cdot-}$. Diese kann entweder physikalisch durch energiereiche Strahlung oder durch Autoxidation reduzierter Zwischenprodukte des Stoffwechsels erfolgen. Durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) werden zwei Superoxid-Moleküle durch Disproportionierung in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Wasserstoffperoxid selbst, welches auch direkt durch die Aktivität verschiedener Oxidasen entstehen kann, ist weniger aggressiv. Es kann jedoch in Gegenwart von Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} durch Übertragung eines Elektrons in ein Hydroxyl-Ion und das äußerst reaktive Hydroxylradikal $\cdot OH$ gespalten werden. Diese Eisen-vermittelte Bildung von Hydroxylradikalen wird als Ursache verschiedener Krankheiten diskutiert^[2].

Das Fehlen von Methoden, mit denen Detektion und Identifizierung sehr geringer Konzentrationen freier Radikale in kondensierter Phase möglich sind, ist die Ursache für unser lückenhaftes Verständnis der Wirkung dieser hoch reaktiven Spezies in vielen chemischen,^[3, 4] ökologischen,^[5] biologischen^[6, 7] und toxikologischen^[8] Prozessen. Die Anwendung der ansonsten zum Radikal-Nachweis gängigen Methode der ESR-Spektroskopie ist in biologischen Systemen stark eingeschränkt, da die entstehenden paramagnetischen Spin-Addukte im reduktiven Milieu der Zelle unbeständig sind und weiter zu den entsprechenden diamagnetischen Verbindungen reagieren. Vielversprechend könnte dagegen die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie sein. Bei Verwendung von entsprechenden Fluoreszenz-Verbindungen wäre eine Detektion von Radikalen auch im biologischen System denkbar. Basierend auf diesem Nachweisverfahren sind das Design, die Synthese sowie die biologische Anwendung spezifischer Fluoreszenzsonden zur Detektion freier Radikale in vitalen Zellen Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen

In den letzten zwei Jahrzehnten richtete sich das wissenschaftliche Interesse zunehmend auf freie Radikale, welche eine zentrale Rolle bei der oxidativen Zerstörung biologischer Systeme einnehmen. Freie Radikale wie das Superoxid-Radikalanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$) und das Peroxylradikal ($\cdot\text{OOH}$) – um nur einige Beispiele zu nennen – entstehen in lebenden Organismen durch Redoxprozesse. Das Superoxid-Radikalanion $\text{O}_2^{\cdot-}$ wird durch Ein-Elektronen-Reduktion des Sauerstoffmoleküls im Grundzustand ($^3\text{O}_2$) erzeugt. Dabei ist die mitochondriale Atmungskette in den meisten Zellen die wichtigste Quelle von $\text{O}_2^{\cdot-}$.^[9] Als Atmungskette wird eine Sequenz von Enzymen und Überträgern bezeichnet, welche für den Transport der Reduktionsäquivalente von NADH zum molekularen Sauerstoff verantwortlich sind. Dabei handelt es sich formal um die stark exergone Reaktion von Sauerstoff und Wasserstoff unter Bildung von Wasser. Diese Reaktion ist auch unter dem Namen Knallgasreaktion bekannt:



Im Gegensatz zur Knallgasreaktion (1) verläuft die Bildung von Wasser in den Mitochondrien über ein Kaskadensystem von Redoxpartnern mit verschiedenen Redoxpotentialen, welche in den Transport von Wasserstoff bzw. Elektronen zum Sauerstoff eingeschaltet sind.

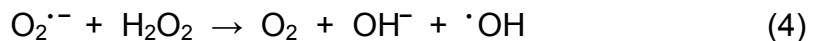
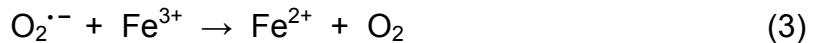
Die im Verlauf des Elektronentransportes von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf Sauerstoff freigesetzte Energie wird zur Regeneration von ATP durch Phosphorylierung von ADP verwendet und damit chemisch gespeichert.

Während des Elektronentransports innerhalb der Atmungskette werden aufgrund von Fehlübertragungen (etwa 1 - 3 %) Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch fortwährend Superoxid-Radikalanionen gebildet werden.

Enzyme wie Superoxiddismutase sind in der Lage, Superoxid in Triplett-Sauerstoff und das weniger reaktive Wasserstoffperoxid umzuwandeln. In Gegenwart von Übergangsmetallionen wie Fe^{2+} oder Cu^+ kann nun Wasserstoffperoxid in das hochreaktive Hydroxylradikal umgewandelt werden. Obwohl auch die Wirkung anderer Metall-Ionen (Ti^{3+} , Co^{2+} u. a.) diskutiert wird, tritt in biologischen Systemen wahrscheinlich überwiegend die Fe^{2+} -abhängige Bildung von OH-Radikalen auf, die sogenannte „Fenton-Reaktion“:^[10]



Das Superoxid-Radikalanion ist ebenfalls an der Bildung von OH-Radikalen *in vivo* beteiligt. Dies kommt in der sogenannten „Haber-Weiss-Reaktion“ (4) zum Ausdruck, welche sich als Netto-Gleichung der Prozesse (2) und (3) ergibt:



Es konnte gezeigt werden, dass die nicht-eisenvermittelte Reaktion (4) alleine praktisch nicht abläuft.^[11-14] Damit wird die Toxizität der unter physiologischen Bedingungen relativ schwach reaktiven Sauerstoffspezies Superoxid und Wasserstoffperoxid vornehmlich auf eine eisenkatalysierte Umwandlung in das hochreaktive Hydroxylradikal zurückgeführt.^[15]

Die Radikale sind in der Lage, biologische Moleküle anzugreifen und dadurch Schäden an Zellorganellen, Chromosomen und Zellmembranen zu verursachen. Derartige chemische Prozesse werden für die Entstehung von Krankheiten wie Arteriosklerose und Krebs sowie für die Zellalterung verantwortlich gemacht.^[16-18] Die genannten Sauerstoffspezies unterscheiden sich stark in ihrer Reaktivität. Während das Superoxid-Radikalanion und das aus $\text{O}_2^{\cdot-}$ entstehende Wasserstoffperoxid relativ wenig reaktiv sind, ist das Hydroxylradikal außerordentlich reaktiv. Es reagiert nahezu diffusionskontrolliert ($k \geq 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)^[19] mit allen an seinem Bildungsort verfügbaren Molekülen, beispielsweise mit Lipiden, Nukleinsäuren, Proteinen und mit Zuckern.^[20] Daher hängt die Art der durch Hydroxylradikale hervorgerufenen Schädigung entscheidend vom Entstehungsort des Radikals ab. Bei der Bildung von OH-Radikalen in räumlicher Nähe zur DNA (Desoxyribonukleinsäure) kommt es zu Modifikationen von Purinen und Pyrimidinen. Oxidative Modifikationen der Zuckerkomponenten (Desoxyribosen) führen häufig zu Strangbrüchen und eine oxidative Veränderung der verschiedenen Basen kann zu Fehlpaarungen führen, die unter Umständen in Punktmutationen resultieren. Auch die Schädigungswirkung des Hydroxylradikals *in vivo* auf Membranlipide ist eingehend untersucht worden. Lipide sind essentieller Bestandteil aller zellulärer Membranen. Die Membranen der tierischen Zelle enthalten z. B. Phospholipide, welche verschiedene gesättigte und ungesättigte Fettsäuren enthalten. Speziell die mehrfach ungesättigten Fettsäuren

werden leicht durch die als Lipidperoxidation bezeichnete Reaktion modifiziert und sind damit für oxidative Angriffe prädestiniert. Die Oxidation der Fettsäuren führt zu kurzkettigen Alkoholen, Aldehyden und Alkanen als Abbauprodukte der Reaktion. Unter bestimmten oxidativen Bedingungen lässt sich so beispielsweise Malondialdehyd und damit indirekt eine Lipidperoxidation mittels der sogenannten „Thiobarbitursäure-Reaktion“ (siehe auch Abschnitt 7.8.7 „Experimenteller Teil“) nachweisen. Der typische Verlauf eines oxidativen Abbaus einer ungesättigten Fettsäure nach dem Angriff durch OH-Radikale ist in vereinfachter Form in Abbildung 2-1 dargestellt.

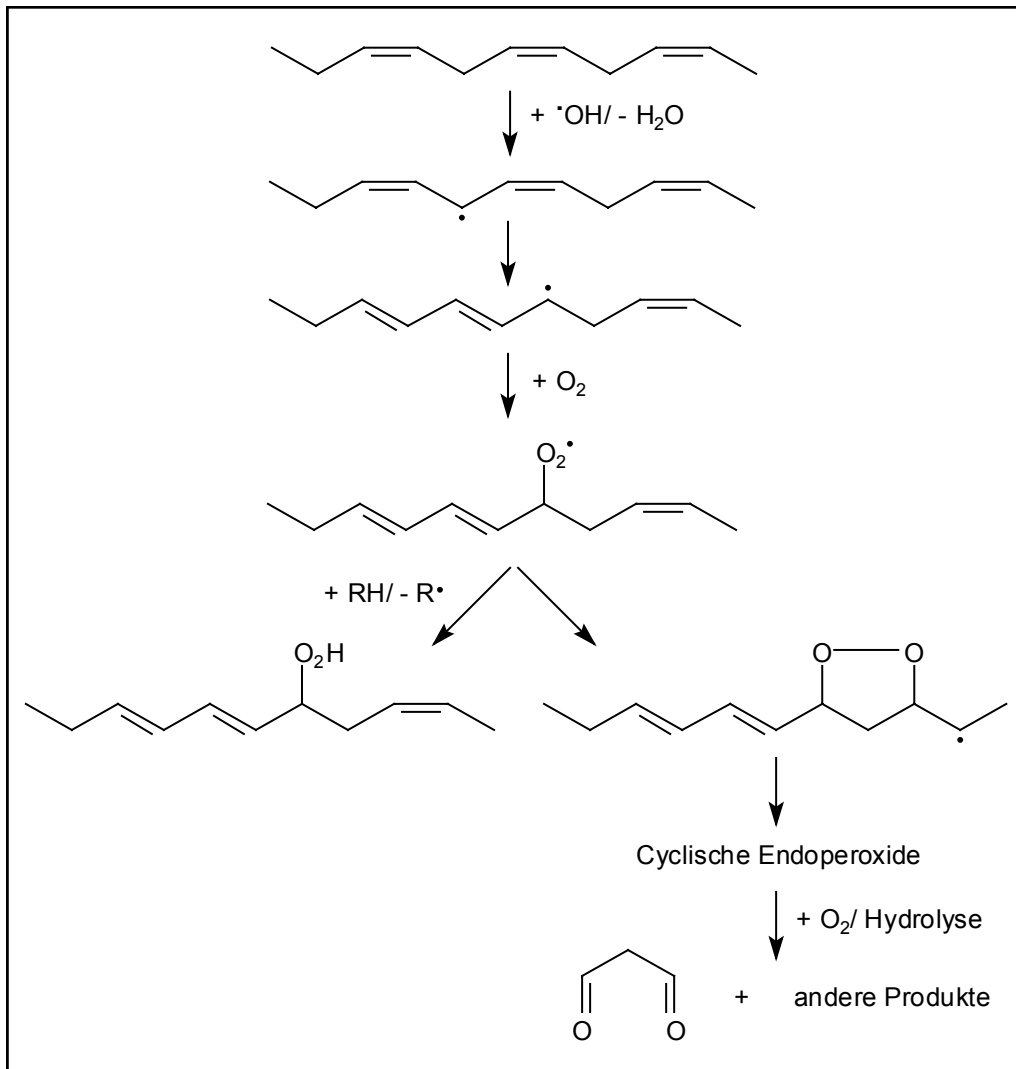


Abbildung 2-1: Vereinfachter Mechanismus der OH-Radikal-vermittelten Oxidation ungesättigter Fettsäuren.^[20]

Vor allem die Bildung des Peroxylradikals ROO^\bullet ist bei der Lipidperoxidation von großer Bedeutung, da es wiederum durch H-Abstraktion von weiteren Lipidmolekülen eine Radikal-Kettenreaktion in Gang setzen kann.

Zum Schutz vor oxidativen Zellschäden verfügt der Organismus über eine antioxidative Strategie, die sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Mechanismen umfasst. Diese Strategie beinhaltet Mechanismen zur Entfernung potentiell toxischer Sauerstoffspezies auf den verschiedenen Stufen ihrer Entstehung sowie zur Blockierung ihrer Reaktionen mit Biomolekülen.^[21] Dazu gehören niedermolekulare Moleküle wie α -Tocopherol (Vitamin E) und Ascorbinsäure (Vitamin C), welche als Radikalfänger fungieren, verschiedene Enzyme wie beispielsweise Superoxiddismutase ($2 \text{ O}_2^{\bullet -} + 2 \text{ H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$)^[1] und Katalase ($2 \text{ H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$)^[1], welche bestimmte Sauerstoffspezies in weniger toxische Verbindungen überführen sowie Rekonstitutionssysteme, die Radikalfänger reaktivieren können (z.B. Glutathion-Reduktase). Daneben verfügt der Organismus noch über eine Reihe von Reparatursystemen, die nach erfolgter Schädigung die beschädigten Stellen „reparieren“ sowie geschädigte Moleküle entfernen (z. B. die Enzyme der DNA-Reparatur). Dennoch bewahren auch diese Schutz- und Reparaturmechanismen nicht immer vor auftretenden Überschussreaktionen oder unerwünschten Nebenreaktionen. Zur Untersuchung von Radikalen in vitalen Zellen stehen zur Zeit nur unzureichende Mittel zur Verfügung, weshalb unser Verständnis der Radikalerzeugung sowie die Lokalisation der Entstehungsorte lückenhaft ist.

2.2 Detektion von Radikalen

Die heute gängigen Methoden der Radikal-Detektion in biologischen Systemen beinhalten verschiedene Probleme. Eine oft angewandte Methode zur Hydroxyl-Radikal-Detektion ist die sogenannte aromatische Hydroxylierung,^[22-24] bei welcher hydroxylierte Produkte aus der Reaktion von OH-Radikalen mit Salicylsäure oder Benzoessäure mittels HPLC separiert und elektrochemisch detektiert werden. Obwohl diese Methode eine hohe Nachweisgrenze hat,^[22, 24] ergeben sich bei Anwendung in biologischen Systemen eine Reihe von Problemen wie multiple Reaktionsprodukte,^[22, 23] sekundäre Erzeugung von Superoxid,^[25] limitierte Löslichkeit, wodurch eine quantitative Reaktion mit Hydroxyl-Radikalen

ausgeschlossen wird, potentielle zelluläre Toxizität bei Konzentrationen, welche für eine effektive Reaktion mit OH-Radikalen erforderlich sind,^[26] sowie eine mögliche Chelatisierung von Eisen und somit Inhibierung der Wirksamkeit von Enzymen.

Die bei weitem am häufigsten angewandte indirekte Methode zur Radikal-Detektion und Identifizierung basiert auf dem Einsatz von Radikalfänger-Molekülen.^[27, 28] Bei dieser Methode werden Radikale durch sogenannte *spin traps* „gefangen“, d.h. sie reagieren zu persistenten Spin-Addukten. Form und Größe der Hyperfeinaufspaltung im ESR-Spektrum des Spin-Adduktes kann in manchen Fällen dazu dienen, die Struktur des gefangenen Radikals zu identifizieren. Dieses im chemischen System oftmals erfolgreiche Verfahren wird dennoch durch eine Vielzahl von Artefakten limitiert, wie z.B. durch die Instabilität von Spin-Addukten,^[29-31] die Notwendigkeit hoher Radikalfänger-Konzentrationen infolge der niedrigen Geschwindigkeitskonstanten für die Abfangreaktion^[32] und die Unfähigkeit, Mischungen strukturell ähnlicher Spin-Addukte aufgrund nicht unterscheidbarer g-Faktoren und/oder Hyperfeinaufspaltungen mittels ESR-Spektroskopie aufzulösen.^[27-29] Eine höhere Selektivität könnte durch Separierung mittels HPLC und anschließender Identifizierung der einzelnen Spin-Addukte mittels ESR-Spektroskopie erreicht werden,^[33, 34] jedoch erschwert die Instabilität der Spin-Addukte die Extraktion, Separierung und strukturelle Identifizierung; in vielen Fällen ist dies sogar unmöglich. Im Mittelpunkt der Erforschung freier Radikale und ihrer Reaktionen in biologischen Systemen steht die Fähigkeit, diese zu identifizieren und ihren Entstehungsort zu lokalisieren. Aus diesem Grunde beschäftigen sich viele wissenschaftliche Arbeitsgruppen mit der Radikalfänger-Methode zur Detektion spezifischer freier Radikale in verschiedenen biologischen Geweben.^[35-37]

Bei dieser Methode reagieren Radikale mit Nitronen oder Nitroso-Verbindungen zu persistenten Nitroxyl-Radikalen (Spin-Addukten). Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Einsatz von persistenten Nitroxyl-Radikalen, den sogenannten Nitroxiden, welche nach Radikalabfang die entsprechenden diamagnetischen Verbindungen bilden, so dass eine Abnahme der ESR-Signalintensität beobachtet wird^[38].

Im biologischen System ist die ESR-Spektroskopie jedoch stark eingeschränkt. Die signalgebenden paramagnetischen Spin-Addukte sind im reduktiven Milieu der Zelle unbeständig und reagieren zu diamagnetischen und somit nicht mittels ESR zu detektierenden Hydroxylaminen ab. Dagegen erlaubt die Fluoreszenzspektrometrie bei Verwendung von entsprechenden Fluoreszenz-Verbindungen die Detektion des

aus dem Nitron, dem Nitroxid oder der Nitroso-Verbindung nach Radikalabfang entstehenden fluoreszierenden Hydroxylamins. Zudem ist die Nachweisgrenze der Fluoreszenzspektroskopie im Vergleich zur ESR-Spektroskopie um ein Vielfaches höher.

2.2.1 RADIKALFÄNGER: NITROXIDE, NITRONE UND NITROSOVERBINDUNGEN

Blough et al. zeigten erstmalig in einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1988, dass durch die kovalente Bindung eines Nitroxids an ein Fluorophor dessen Fluoreszenzquantenausbeute ohne Veränderung der Absorptions- und Emissionsenergien signifikant erniedrigt („gelöscht“) werden kann. Der Verlust des paramagnetischen Zentrums hingegen steigert die Fluoreszenzquantenausbeute.^{[[39]]} Die zwischen 1988 und 2005 publizierten Arbeiten auf dem Gebiet der fluoreszierenden Radikalfänger können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen die Arbeiten, in denen kovalent an Fluorophore gebundene Nitroxide untersucht wurden,^[38-48] zum anderen Arbeiten, in denen Nitrone kovalent an Fluorophore gebunden wurden.^[49] Der weitaus größere Teil der Arbeiten beschäftigt sich dabei mit den Fluorophor-Nitroxiden.

Der Vorteil der Nitroxide ist ihre geringe Fluoreszenzintensität, deren Anstieg nach Radikalabfang durch Verlust des paramagnetischen Zentrums gut detektierbar ist. Ihr großer Nachteil ist jedoch die extreme Reduktionsempfindlichkeit. Da auch durch eine Reduktion des Nitroxids ein diamagnetisches, fluoreszierendes Produkt erhalten wird, kann im Beisein von Reduktionsmitteln wie z. B. Ascorbat nicht mehr unterschieden werden, ob ein Anstieg der Fluoreszenzintensität durch Radikalabfang oder durch Reduktion erfolgt. Aufgrund des hohen Anteils an Reduktionsäquivalenten in lebenden Zellen verbietet sich daher ein Einsatz von Fluorophor-Nitroxiden in biologischen Systemen.

Fluorophor-Nitrone haben dagegen den Vorteil, auf Reduktionsmittel weniger empfindlich zu reagieren.^[49] Da sie jedoch eine ebenso hohe Quantenausbeute besitzen wie die nach Radikalabfang entstehenden Hydroxylamine, muss hierbei entweder eine Wellenlängenverschiebung von Nitron zu Hydroxylamin resultieren oder die Fluoreszenzintensität des eingesetzten Nitrons muss durch entsprechende Maßnahmen reduziert, bestenfalls vollständig gelöscht werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung einer Nitroso-Verbindung, welche aufgrund ihrer Eigenschaft als Elektronenakzeptor eine Fluoreszenz löschende Wirkung auf das angeschlossene Fluorophor ausübt. Nach Radikalabfang entsteht dabei wiederum ein Hydroxylamino-Derivat. Dieses sollte als Elektronendonator fungieren, wodurch die Fluoreszenzquantenausbeute des Fluorophors ansteigen könnte. Die Reduktionsempfindlichkeit der Nitrosoverbindung ($E_{1/2} = -0.08 \text{ V}$ in Puffer/20 % Methanol, pH 7.0)^[50] liegt dabei zwischen der des Nitroxids ($E_{1/2} = +0.11 \text{ V}$ in Phosphatpuffer pH 6.8)^[51] und des Nitrons ($E_{1/2} = -0.13 \text{ V}$ in Wasser, pH 7.0),^[52] so dass die Möglichkeit besteht, von den in der Zelle vorhandenen Reduktionsäquivalenten nicht oder nur in geringem Maße zum fluoreszierenden Produkt reduziert zu werden. In Abbildung 2-2 sind die Mechanismen des Radikalabfanges durch Nitroxide, Nitrone und Nitrosoverbindungen sowie die Reduktion der Radikalfänger dargestellt.

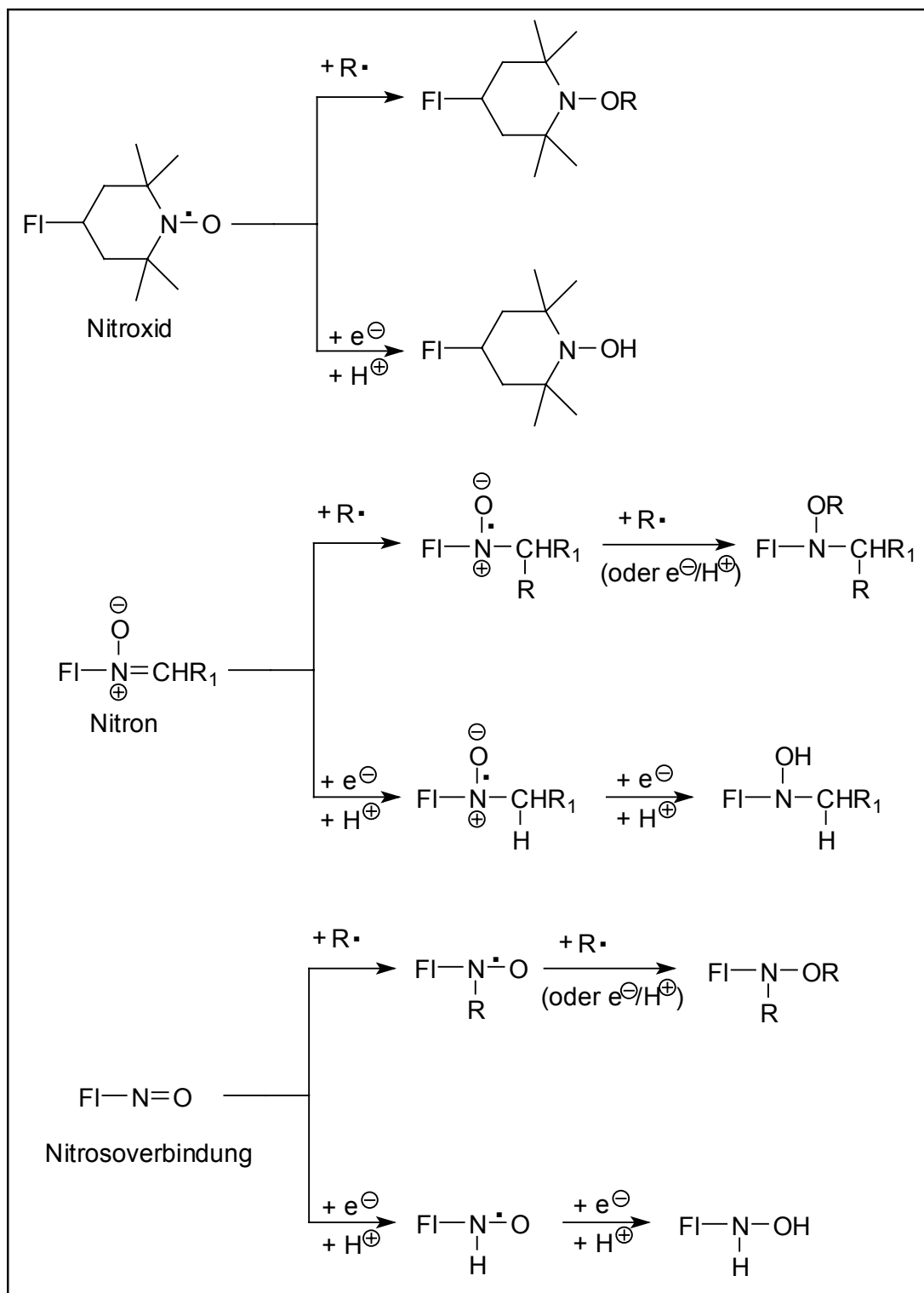


Abbildung 2-2: Entstehung von Hydroxylamino-Derivaten aus dem Radikalabfang bzw. durch Reduktion von Nitroxiden, Nitronen und Nitrosoverbindungen (FI bezeichnet hierbei das Fluorophor).

Aus den oben genannten Gründen sollten im Rahmen dieser Arbeit Radikalsonden entwickelt werden, die neben der Fängerfunktion, dem Nitron oder der Nitroso-Verbindung, als signalgebendes Molekülteil ein Fluorophor enthalten.

Nach Abfang der Radikale soll durch die eintretende Änderung des konjugierten Systems eine Verschiebung der Fluoreszenz oder eine Änderung der Fluoreszenzintensität eintreten.

2.3 Fluoreszenzspektroskopische Methoden zur Bestimmung von Radikalen

Fluoreszenzspektroskopische Bestimmungsmethoden für Radikale basieren auf Fluoreszenzsonden, die eine schnelle Veränderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften als Ergebnis einer Abfangreaktion mit Radikalen erfahren. Solche Radikalsonden enthalten neben dem signalgebenden Molekülteil (fluoreszenzgebende Komponente oder Fluorophor) noch eine „Reaktivgruppe“ - eine Fängerfunktion (Nitron, Nitrosogruppe oder Nitroxid), die den Abfang eines Radikals ermöglicht.

2.3.1 DER PROZESS DER FLUORESZENZ

Einige Moleküle und molekulare Systeme zeigen bei Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge eine spezifische Lichtemission, die sogenannte Photolumineszenz. Diese wird formal in zwei Kategorien unterteilt, die Phosphoreszenz und die Fluoreszenz. Sie unterscheiden sich lediglich in der elektronischen Natur der Ausgangszustände der das Licht aussendenden Moleküle, d.h. sie gehen vom ersten angeregten Singulettzustand (S_1) bzw. Triplettzustand (T_1) aus (Abbildung 2-3).

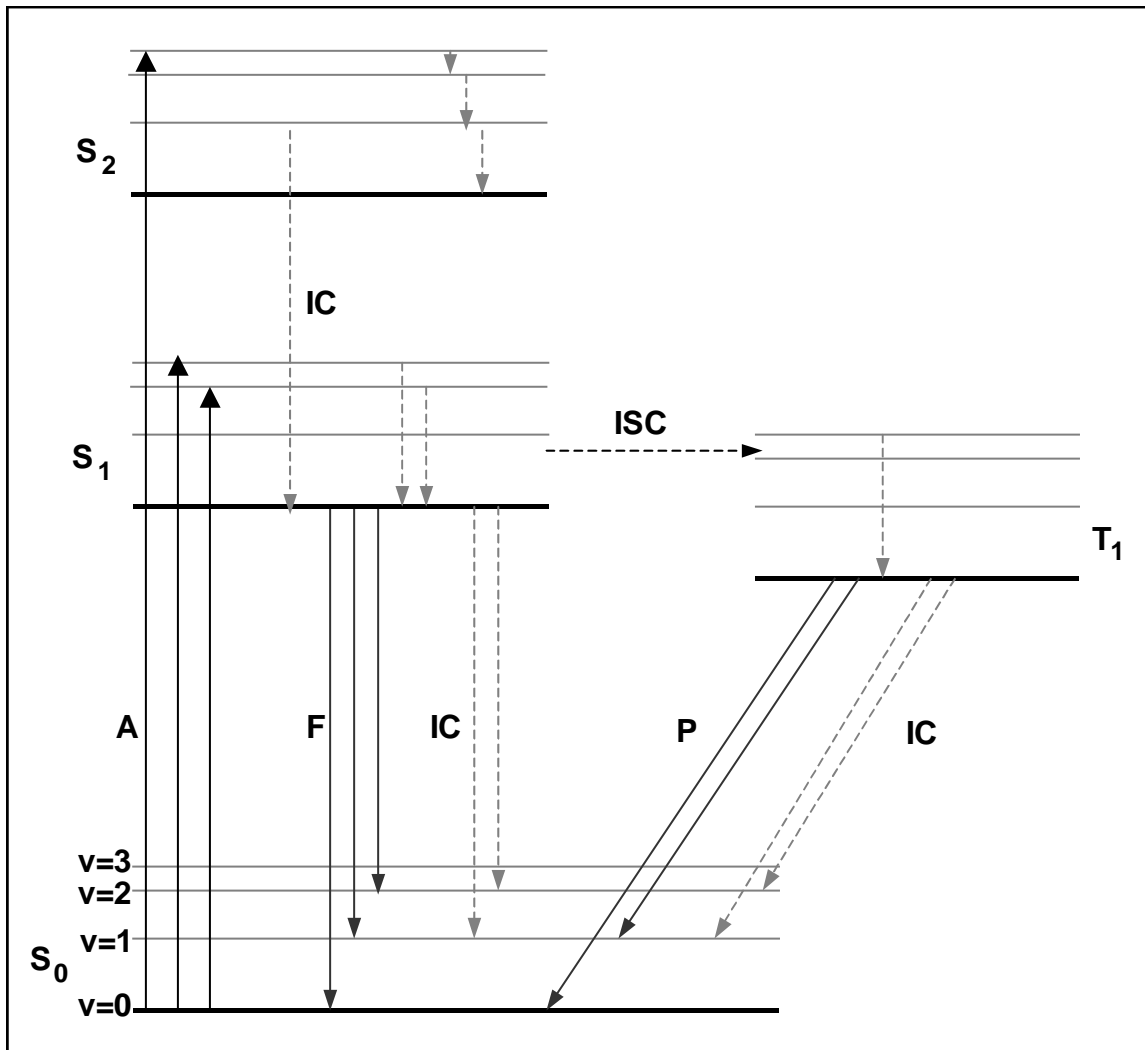


Abbildung 2-3: Vereinfachtes Termschema (Jablonski-Diagramm) photophysikalischer Prozesse (— strahlende Prozesse, --- strahlungslose Prozesse).^[53]

Wird ein Molekül in einen der höheren elektronischen Zustände S_n ($n \geq 1$) angeregt, relaxiert es innerhalb von etwa 10^{-14} s stets strahlungslos zum S_1 -Zustand, von dem aus der elektronische Grundzustand S_0 über verschiedene Relaxationskanäle erreicht werden kann (eine Ausnahme bildet hier das Azulen, bei welchem die Fluoreszenzemission vom S_2 -Zustand ausgeht). Es besteht zum einen die Möglichkeit des strahlungslosen Energietransfers auf andere Moleküle (Fluoreszenzlöschung, z. B. durch Kollision oder Resonanz-Energietransfer (FRET)), das Ablaufen von photochemischen Reaktionen und vor allem der interne Energietransfer, d.h. die Energieumverteilung innerhalb eines Moleküls. Hierbei unterscheidet man das sogenannte *intersystem crossing* (ISC, Spinumkehr) von dem angeregten Singulettzustand (S_1) in den Triplettzustand (T_1) und zum anderen die

interne Konversion (*internal conversion*, IC), wobei das Molekül seinen Spinzustand beibehält und durch Abgabe von Rotations- und Schwingungsenergie zunächst in den tiefsten Vibrationszustand übergeht. Anschließend relaxiert es entweder strahlungslos zurück zum Grundzustand S_0 (IC, ISC) oder durch Lichtemission von S_1 zu S_0 (Fluoreszenz, F) bzw. von T_1 zu S_0 (Phosphoreszenz, P).

Strahlungslose Prozesse wie IC und ISC führen als Konkurrenzreaktionen der Fluoreszenz zu einer Verminderung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F , welche eine wichtige Maßzahl zur Quantifizierung des Fluoreszenzvermögens einer Verbindung ist (Gleichung 5). Sie ist definiert als Quotient der Anzahl der emittierten und der Anzahl der absorbierten Photonen.^[54]

$$\Phi_F = \frac{\text{Zahl emittierter Lichtquanten}}{\text{Zahl absorbierter Lichtquanten}} \quad (5)$$

Aufgrund des Energieverlustes während der Schwingungsrelaxation in den tiefsten Vibrationszustand von S_1 ist die emittierte Energie $h\nu_{em}$ geringer als die absorbierte Energie $h\nu_{exc}$ und demzufolge die Emissionswellenlänge größer als die der Absorption (A). Die Energiedifferenz $h\nu_{exc} - h\nu_{em}$ wird als „Stokes-Verschiebung“ bezeichnet. Derzeit ist eine quantitative Voraussage über das Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit von der Struktur des Moleküls kaum möglich. Ein Vergleich fluoreszierender Moleküle zeigt allerdings, dass Fluoreszenzfarbstoffe ein weitgehend rigides Molekülgerüst besitzen, da andererseits über Schwingungen und Rotationen flexibler Strukturelemente bevorzugt oder ausschließlich eine strahlungslose Deaktivierung des angeregten Fluorophors erfolgt. Klassische Fluorophore wie die Rhodamine und BODIPY's zeichnen sich durch ein ausgedehntes planares π -Elektronensystem aus. Ihr Fluoreszenzverhalten wird durch einen π, π^* -Anregungszustand bestimmt.

2.3.2 FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE

Nach dem Kirchhoff'schen Gesetz ist die Fluoreszenzspektroskopie lediglich die Umkehrung der Absorptionsspektroskopie. Es besagt, dass jedes Atom, welches für

eine bestimmte Wellenlänge ein guter Absorber ist, prinzipiell ebenso gut Quanten mit der gleichen Wellenlänge emittieren kann. Demnach kann dieselbe Information sowohl absorptions- als auch fluoreszenzspektrometrisch erhalten werden. Jedoch gibt es zwischen beiden Arten einen grundlegenden Unterschied, der in der Messmethodik begründet ist. Die Absorption A einer Spezies ist nach Gleichung 6 definiert als:

$$A(\lambda) = \log I_0/I = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (6)$$

Dabei bezeichnet I_0 die Intensität des eingestrahnten Lichts, I die des hindurch gelassenen Lichts, c die Konzentration, d die Schichtdicke und $\varepsilon(\lambda)$ den Extinktionskoeffizienten. Gemessen wird hierbei der Lichtanteil I , welcher nicht absorbiert wurde, d.h. die Bestimmung der Absorption ist eine indirekte Nachweismethode. Die Gerätedispersion wird hierbei durch den Vergleich mit einer Referenz eliminiert und ein absolutes Absorptionsmaß A definiert. Aufgrund der erforderlichen Referenzbildung ist die Absorptionsmessung um 2-3 Größenordnungen weniger empfindlich als die Fluoreszenzmessung. Fluoreszenzmessungen sind dagegen relativ, jedoch direkt. Es wird unmittelbar das Licht bestimmt, welches die untersuchte Spezies emittiert. Während in der Absorptionsspektroskopie als einziger Messparameter die Absorption A bestimmt werden kann, erlaubt die Fluoreszenzspektroskopie die Messung verschiedener, von einander unabhängiger Parameter wie z. B. der Quantenausbeute Φ_F , der Reichweite R_c für strahlungslosen Energietransfer (FRET), der Lebensdauer τ und der Stokes-Verschiebung $\Delta\lambda$.

2.3.3 FLUORESZENZERNIEDRIGUNG UND FLUORESZENZLÖSCHUNG

Die Wellenlänge sowie die Fluoreszenzintensität reagieren empfindlich auf äußere Einflüsse wie Temperatur, Viskosität oder Polarität des Lösungsmittels. Bei Steigerung der Polarität kann die Emission des Farbstoffes abnehmen sowie eine Rotverschiebung auftreten. Dies liegt darin begründet, dass sich zum einen die Elektronenwolke durch elektronische Anregung ausdehnt, wodurch sich ihre Polarisierbarkeit vergrößert und damit die Anregungsenergie erniedrigt wird. Zum

anderen läuft der Prozess der elektronischen Anregung (10^{-15} s) wesentlich schneller ab als die Reorientierung der Kerne und der Lösungsmittelmoleküle mit etwa 10^{-10} s (Franck-Condon-Prinzip). Dies ist besonders ausgeprägt im Lösungsmittel Wasser, welches ein großes Dipolmoment besitzt. Abbildung 2-4 zeigt am Beispiel des Flavins die lösungsmittelabhängigen Wellenlängenmaxima und Fluoreszenzquantenausbeuten.

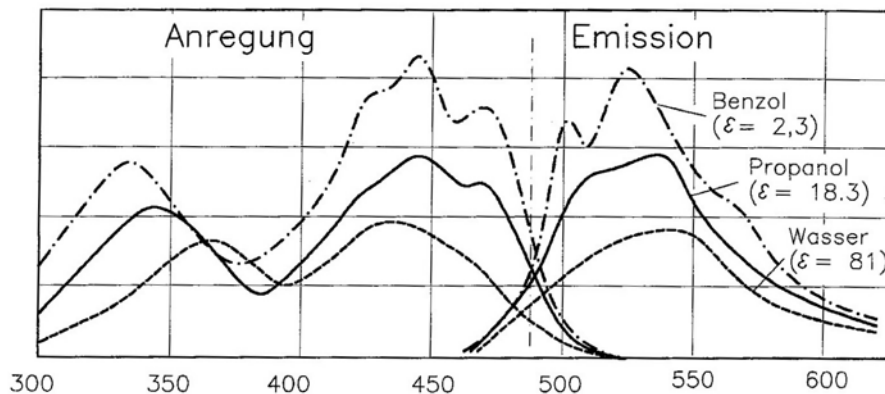


Abbildung 2-4: Absorptions- und Emissionsspektren von Flavin in unterschiedlich polaren Lösungsmitteln (angegeben als Dielektrizitätskonstante ϵ , Wellenlänge in nm).^[55]

Wie bereits in Kapitel 2.3.1 erwähnt bestehen unterschiedliche Möglichkeiten der Reduzierung bzw. der Löschung der Fluoreszenzintensität. Eine besondere Art der Fluoreszenzlöschung eines Farbstoffes zeigt sich in dem sogenannten resonanten Fluoreszenzenergietransfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) oder auch Förster-Energietransfer. Dabei handelt es sich um einen strahlungsfreien Prozess, bei dem ein Donor (D) im angeregten Zustand Energie auf einen Akzeptor (A) im Grundzustand über weitreichende Dipol-Dipol-Wechselwirkungen überträgt. Bei einer optimalen Energieübertragung vom Donor auf den Akzeptor wird die Fluoreszenz des Donors somit vollständig gelöscht; stattdessen ist die Fluoreszenz des Akzeptors zu sehen. In Abbildung 2-5 ist ein vereinfachtes Termschema (Jablonski-Diagramm) für den FRET-Effekt dargestellt.

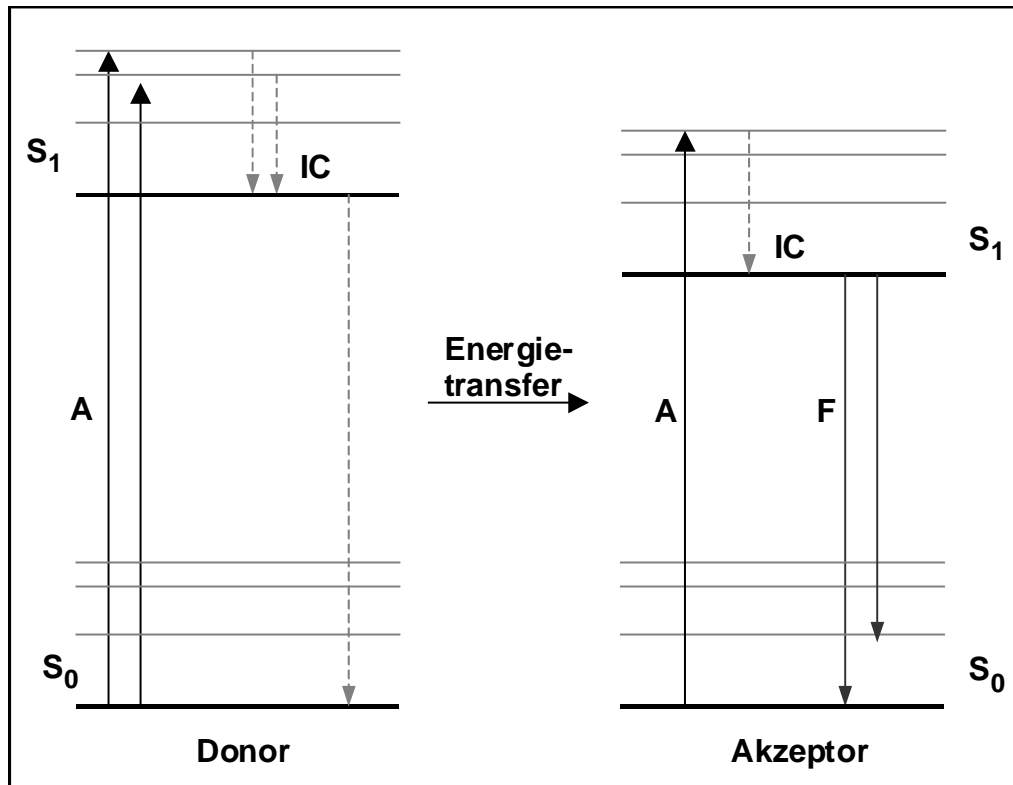


Abbildung 2-5: Jablonski-Diagramm für den FRET-Effekt (— strahlende Prozesse, --- strahlungslose Prozesse).

Voraussetzung für den FRET-Effekt ist, dass der Akzeptor bei der Emissionswellenlänge des Donors Energie aufnehmen kann, d.h. das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Der Anteil der übertragenen Energie und damit die Intensität des FRET-Effekts ist von 3 Faktoren abhängig:

- vom Grad der spektralen Überlappung ($J(\lambda)$) (siehe Abbildung 2-6),
- vom Abstand (r) zwischen Donor und Akzeptor, wobei der Effekt nur bei einem Abstand von $< 100 \text{ \AA}$ auftritt,
- von der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente (κ^2).

Abbildung 2-6 zeigt am Beispiel der Fluorophore Fluorescein (Donor) und Rhodamin (Akzeptor) die schematische Darstellung des FRET-Effektes.

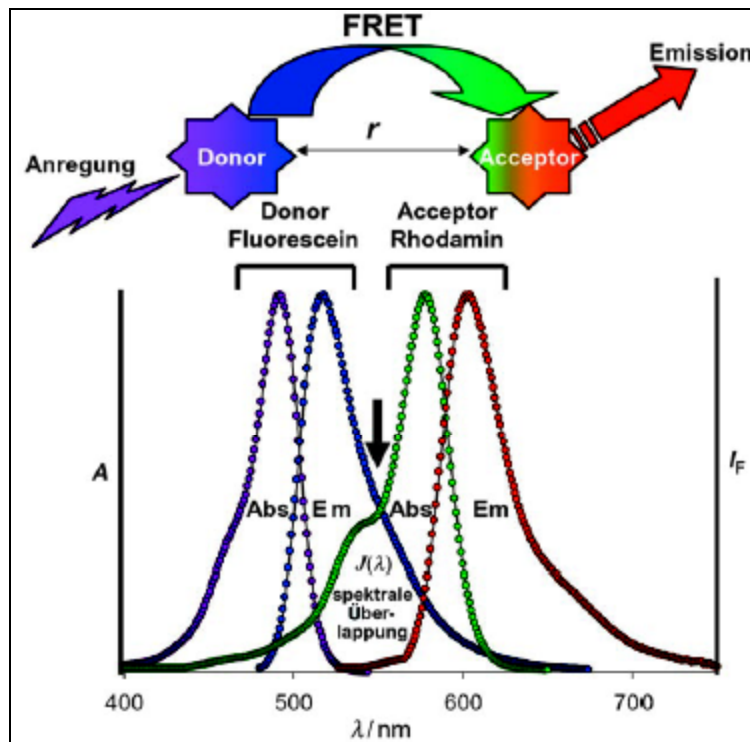


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des FRET-Effektes (A = normalisierte Absorption, I_F = normalisierte Fluoreszenz).^[56]

Der FRET-Effekt findet vor allem in der Biologie, Biochemie und Medizin Anwendung. Für die Bioanalytik ist insbesondere die Empfindlichkeit von FRET gegenüber kleinen Änderungen des Abstandes zwischen Donor und Akzeptor interessant. Dabei werden die Fluorophore an genau festgelegte Positionen in Biomolekülen konjugiert. Die Anwendung reicht von der Untersuchung der Antigen-Bindung an einen Antikörper in vitro bis hin zur Echtzeitabbildung der Proteinfaltung in vivo.^[57, 58]

Die folgenden Gleichungen beziehen sich auf die Energieübertragung zwischen einem gekoppelten D/A-Paar mit einem festen Abstand r . Die Geschwindigkeit der Energieübertragung $k_T(r)$ zwischen Donor und Akzeptor hängt von ihrem Abstand r ab und kann mit dem Förster-Abstand R_0 beschrieben werden. R_0 ist dabei die Entfernung zwischen Donor und Akzeptor, bei der die Hälfte der angeregten Donormoleküle über den Mechanismus der Energieübertragung zerfallen und die andere Hälfte über andere strahlende und strahlungslose Wege zerfallen. Die Bestimmung von R_0 kann nach Gleichung 7 über die spektralen Eigenschaften von Donor und Akzeptor erfolgen.

$$R_0 = 9.78 \times 10^3 [\kappa^2 n^{-4} \Phi_D J(\lambda)]^{1/6} \text{ (in \AA)} \quad (7)$$

Dabei ist Φ_D die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, n der Brechungsindex des Mediums und $J(\lambda)$ das Überlappungsintegral von Emissions- (D) und Absorptionsspektrum (A). Der Faktor κ^2 beschreibt die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente des Donors und des Akzeptors. Es gibt allerdings keine verlässliche experimentelle Methode, um absolute oder feste κ^2 -Werte zu bestimmen, so dass die Rechnungen mit Unsicherheiten behaftet sein können. Für biologische Systeme wird ein κ^2 -Wert von 2/3 für die Beweglichkeit und statistische Dynamik der Farbstoff-Linker angenommen, womit die obere Fehlergrenze für berechnete Entfernungen bei 35 % liegt.^[59] Ist der Förster-Abstand R_0 bekannt, kann die Geschwindigkeit der Energieübertragung $k_T(r)$ mittels Gleichung 8 berechnet werden:

$$k_T(r) = \tau_D^{-1} (R_0/r)^6 \quad (8)$$

Hierbei wird deutlich, dass der Energietransfer effizient ist, wenn die Geschwindigkeit der Energieübertragung $k_T(r)$ größer ist als die Lebensdauer τ_D des Donors im angeregten Zustand. Die Effizienz des Energietransfers E ist der Bruchteil der durch den Donor absorbierten Photonen, die auf den Akzeptor übertragen werden. Die Effizienz ist gegeben durch

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (9)$$

Gleichung 9 zeigt die starke Abhängigkeit der Effizienz von der Entfernung r zwischen Donor und Akzeptor. Die Effizienz des Energietransfers wird im Allgemeinen unter Verwendung der relativen Fluoreszenzintensität des Donors in An- (F_{DA}) und Abwesenheit (F_D) des Akzeptors gemessen:

$$E = 1 - (F_{DA} / F_D) \quad (10)$$

Eine weitere Einflussgröße auf die Effizienz des Energietransfers ist neben dem Abstand r der Orientierungsfaktor κ^2 , der gegeben ist durch:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T - 3 \cos\theta_D \cos\theta_A)^2 \quad (11)$$

$$\kappa^2 = (\sin\theta_D \sin\theta_A \cos\phi - 2 \cos\theta_D \cos\theta_A)^2 \quad (12)$$

In den Gleichungen 11 und 12 ist θ_T der Winkel zwischen dem Emissions-Übergangsdipolmoment des Donors und dem Absorptions-Übergangsdipolmoment des Akzeptors, θ_D und θ_A die Winkel zwischen diesen Dipolmomenten und dem Verbindungsvektor von Donor und Akzeptor und ϕ der Winkel zwischen den Ebenen (Abbildung 2-7).

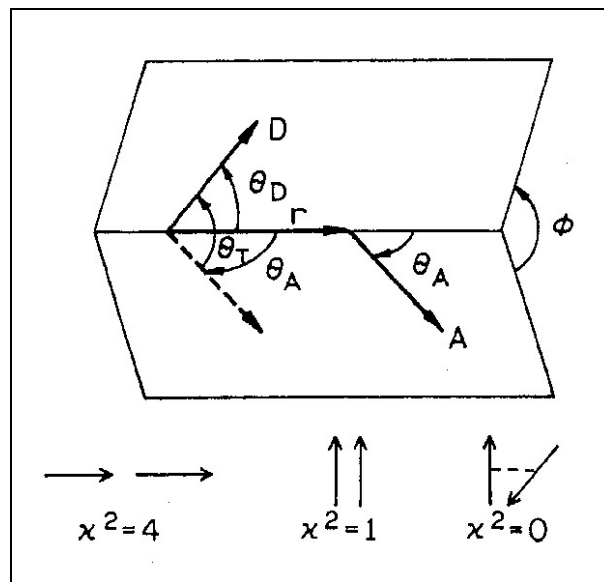


Abbildung 2-7: Abhängigkeit des Orientierungsfaktors κ^2 von der Ausrichtung des Emissionsdipols des Donors und des Absorptionsdipols des Akzeptors.^[59]

Basierend auf der relativen Orientierung von Donor und Akzeptor nimmt κ^2 Werte zwischen 0 (senkrecht) und 4 (kolinear-parallel) an. Während experimentell der Nachweis gelang, dass die Energietransfereffizienz mit r^{-6} vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor^[60-62] und linear vom Überlappungsintegral $J(\lambda)$ abhängig ist,^[63] fehlt bislang die experimentelle Bestätigung für den Grad der Abhängigkeit vom Orientierungsfaktor κ^2 .

Sowohl bei der Variation des Lösungsmittels wie auch bei dem FRET-Effekt erfolgt die Erniedrigung der Fluoreszenzintensität durch Interaktion des Fluorophors mit seiner Umgebung. Eine Intensitätserniedrigung kann aber auch durch konjugierte Anbindung von Elektronen-Akzeptoren an ein Fluorophor, also intramolekular, erfolgen. Bei der Einführung von Elektronen ziehenden Gruppen wie der Nitroso- und der Nitroxid-Gruppe wird die Fluoreszenzintensität erniedrigt. Dies kann anhand des Photoinduzierten Elektronentransfers (PET) verdeutlicht werden.

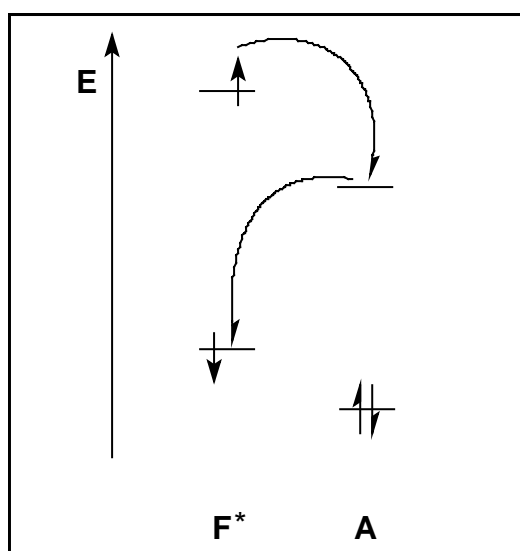


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung der intramolekularen Fluoreszenzlöschung durch PET.

In Abbildung 2-8 ist schematisch die intramolekulare Fluoreszenzlöschung durch ein an das Fluorophor F konjugiertes Löschmolekül (Elektronen-Akzeptor A) dargestellt. Im Grundzustand sind Redoxprozesse mit einem hohen Energieaufwand verbunden. Im angeregten Zustand des Fluorophors F^* verläuft die Abgabe eines Elektrons (Farbstoffoxidation) leichter, da das Ionisierungspotential durch die Anhebung des Elektrons aus dem HOMO (*highest occupied molecular orbital*) in das LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) erniedrigt worden ist. Ebenso verläuft auch die Aufnahme eines Elektrons (Farbstoffreduktion) leichter, da ein „Elektronenloch“ entstanden ist (nicht abgebildet). Dieser Redoxprozess ist jedoch nicht permanent, d.h. es findet weder eine Oxidation des Fluorophors noch eine Reduktion des konjugierten Löschmoleküls statt. Es handelt sich vielmehr um einen Austausch von Elektronen, der in der Erniedrigung der Fluoreszenz resultiert.

2.3.4 PRINZIP DER FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHEN BESTIMMUNGSMETHODE IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN

Alle bisher bekannten fluoreszenzspektroskopischen Methoden zur Untersuchung von Radikalen basieren auf dem Einsatz von Nitroxiden mit kovalent gebundenen Fluorophoren als signalgebende Komponenten.^[38-48] Allerdings wurde in der Literatur bisher lediglich der Abfang von Radikalen in chemischen Systemen sowie in biologischen Systemen in vitro (in lysierten Zellen^[38]) erfolgreich untersucht. Aufgrund der hohen Reduktionsempfindlichkeit von Nitroxiden und dem in vitalen Zellen vorliegenden reduktiven Milieu ist ein Einsatz dieser Radikalsonden in lebenden Zellen nicht möglich, da ein Anstieg der Fluoreszenzintensität sowohl durch Radikalabfang als auch durch Reduktion zum Hydroxylamin erfolgen würde. Das Prinzip der fluoreszenzspektroskopischen Bestimmung von Radikalen in biologischen Systemen basiert daher auf dem Einsatz von weniger reduktionsempfindlichen Radikalfängern wie den Nitronen und Nitrosoverbindungen. Die geringe Fluoreszenz in die Zellen eingebrachter Fluoreszenzsonden mit Radikalfängerfunktion wird durch den Abfang der in den Zellen vorhandenen Radikale durch Bildung der stark fluoreszierenden Hydroxylamine erhöht. Dabei führt die Reaktion der Fluoreszenzsonde mit einem Radikal zunächst zum persistenten Spin-Addukt (Nitroxid), welches aufgrund des paramagnetischen Zentrums eine geringe Fluoreszenz aufweist. Durch eine anschließende Reduktion des Nitroxids oder durch den Abfang eines zweiten Radikals wird das diamagnetische, fluoreszierende Hydroxylamin gebildet.

Zur Verwendung der Fluoreszenzsonden in biologischen Systemen werden die kultivierten Zellen mit einer lipophilen und damit membranpermeablen Radikalsonde beladen. Die intrazelluläre Konzentration und Verteilung einer solchen Sonde hängt von der Beladungskonzentration, der Temperatur und der Beladungszeit ab. Die intrazelluläre Indikatorkonzentration übertrifft aufgrund des Akkumulationsverhaltens gewöhnlich die angewandte Beladungskonzentration um ein Vielfaches.^[64]

2.3.5 BEKANNTE FLUORESZENZ-RADIKALSONDEN ZUR DETEKTION VON RADIKALEN IN BIOLOGISCHEN SYSTEMEN

Alle bislang in der Literatur veröffentlichten fluoreszierenden Radikalsonden fanden fast ausschließlich nur in chemischen Systemen als Radikaldetektoren Anwendung. Lediglich eine Anwendung im biologischen System wurde von *Pou et al.* im Jahre 1993 beschrieben, wobei hier jedoch eine Isolierung von Neutrophilen Granulozyten (zu den Leukozyten gehörenden Blutzellen) aus dem menschlichen Blut stattfand.^[38] Da es sich bei der Sonde von *Pou et al.* um ein Fluorescamin-derivatisiertes Nitroxid handelt, ist anzunehmen, dass bei einer Anwendung in vitalen Zellen aufgrund des reduktiven Milieus der Zelle das Nitroxid zum fluoreszierenden Hydroxylamin reduziert werden würde. Dadurch wäre eine Bestimmung von Radikalen in der Zelle unmöglich. Eine erfolgreiche fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von Radikalen in vitalen Zellen konnte zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit in der Literatur nicht nachgewiesen werden.

3 PROBLEMSTELLUNG

Trotz der aufgezeigten großen physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung ist die Detektion und Identifizierung geringer Konzentrationen freier Radikale in vitalen Zellen noch immer unzureichend. Die zur Zeit etablierten Methoden sind ausnahmslos sehr anfällig für Fehlinterpretationen und daher nicht in vitalen Zellen anwendbar.^[38-48] Die in diesen Untersuchungen verwendeten Fluoreszenzindikatoren erwiesen sich aufgrund ihrer Fängerfunktion, dem Nitroxid, als stark reduktionsempfindlich, wodurch sie bereits aufgrund des in vitalen Zellen vorherrschenden reduktiven Milieus zu fluoreszierenden Produkten reduziert werden. Vor diesem Hintergrund sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Fluoreszenzsonden zum selektiven Nachweis von Radikalen in vitalen Zellen entwickelt werden. Primäres Ziel war zunächst die Synthese von Fluoreszenzindikatoren für C- und O-zentrierte Radikale mit einer hohen Membranpermeabilität. Zu diesem Zweck mussten die Molekülkomponenten Fluorophor und Radikalfänger gezielt ausgewählt und durch geeignete Derivatisierung konjugiert werden. Nach erfolgreicher Synthese sollten die Eigenschaften der neuen Fluoreszenzindikatoren im Hinblick auf ihren Einsatz in biologischen Systemen zunächst im zellfreien System untersucht werden. Zu den wichtigsten Informationen zählte in diesem Zusammenhang, ob eine Veränderung der Fluoreszenzintensität und/oder Lage der Absorptions- bzw. Emissionsmaxima durch Radikalabfang erfolgen kann. Bei nachgewiesener potentieller Eignung der Indikatoren im zellfreien System sollte der Einsatz der neu entwickelten Radikalsonden im zellulären System etabliert werden. Die Elektronenübertragung auf den Sauerstoff im Rahmen der Zellatmung macht die Mitochondrien in den meisten Zellen zur primären Quelle reaktiver Sauerstoffspezies. Aufgrund der hohen Mitochondrien-Konzentration in Hepatozyten sollten für die Untersuchungen daher zunächst kultivierte Rattenhepatozyten verwendet werden. Für die Untersuchungen im zellulären System mussten zunächst Bedingungen gefunden werden, die eine zweckentsprechende Beladung der Zellen mit den Indikatoren garantieren. Neben den Untersuchungen hinsichtlich des Schädigungsgrades der Zellen durch den Indikator, einer eventuellen Protektivität sowie der Verteilung des Indikators in den Zellen wurde auch ein erster Einsatz der Indikatoren in pathobiochemischen

Fragestellungen angestrebt. Ansatzpunkte sollten hier verschiedene Modelle der Zellschädigung bilden wie z. B. die Histidin- oder die Eisen-induzierte Schädigung.

4 ENTWICKLUNG UND UNTERSUCHUNG VON FLUORESZENZSONDEN ZUM NACHWEIS VON RADIKALEN

4.1 Aufbau der Radikalsonden

Die Synthese der Radikalsonden sollte durch die Kupplung von Fluorophoren an Radikalfänger erfolgen. Für den Einsatz im zellulären System musste zudem eine ausreichende Lipophilie der möglichen Indikatoren gewährleistet sein, die ihre Membranpermeabilität garantiert. Da bislang noch kein zufriedenstellend funktionierendes Messprinzip von Radikalen in vivo existiert, wurde zunächst auf eine Zielsteuerung zur Akkumulation der Sonde in bestimmten Kompartimenten der Zelle verzichtet. Das Augenmerk richtete sich bei der Entwicklung der Fluoreszenzsonden vorerst ausschließlich auf die Erfassung von C- und O-zentrierten Radikalen und die daraus resultierende Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften der Sonden.

4.1.1 DIE FÄNGERFUNKTION

Aufgrund der in der Literatur als Radikalfänger zwar oft eingesetzten, jedoch stark reduktionsempfindlichen Nitroxide sollte die Fängerfunktion bei den zu synthetisierenden Sonden die Nitron- bzw. die Nitroso-Gruppe übernehmen. Hierbei bestand die Möglichkeit, dass beide Fänger-Gruppen durch die in lebenden Zellen vorhandenen Reduktionsäquivalente nicht oder nur in geringem Maße zu den entsprechenden Hydroxylamino-Derivaten reduziert würden.

Zudem sollte eine direkte Anbindung der Fänger-Gruppe an das Fluorophor gewährleistet sein, so dass ein Einfluss dieser durch Radikalabfang veränderten Gruppe auf das fluorophore System hinsichtlich der Fluoreszenzintensität und/oder der Verschiebung der Wellenlänge erfolgen konnte.

Bei der Anbindung der Nitroso-Gruppe an ein Fluorophor bestand die Annahme, dass aufgrund der zunächst vorliegenden Funktion als Elektronen-Akzeptor eine geringe Fluoreszenzintensität vorliegt. Nach Radikalabfang sollte das entstehende

Hydroxylamin eine Elektronen-Donorfunktion ausüben, wodurch die Intensität der Fluoreszenz ansteigen sollte.

Bei dem Einsatz des Nitrons als Radikalfänger sollten vier mögliche Mechanismen zur Detektion von Radikalen untersucht werden. Zunächst sollte festgestellt werden, ob durch den direkten Einbau der Nitron-Gruppe in ein Fluorophor eine Unterbrechung des konjugierten Systems durch Radikalabfang und damit eine Fluoreszenzlöschung möglich ist. Zum anderen sollte untersucht werden, ob das Nitron als „Brücke“ zwischen zwei Fluorophoren dazu dienen könnte, vor dem Radikalabfang durch Konjugation der beiden fluorophoren Systeme eine Veränderung der Absorptions- bzw. Emissionswellenlänge zu erreichen. Durch Radikalabfang sollte die C=N-Doppelbindung im Nitron in eine Einfachbindung (Hydroxylamino-Derivat) umgewandelt werden, welche eine Konjugation beider Fluorophore nicht mehr gewährleisten würde. Eine dritte Möglichkeit bestand in der Annahme, dass aufgrund der zunächst vorliegenden Nitron-Einheit, welche wie die Nitroso-Gruppe als Elektronen-Akzeptor fungieren könnte, eine geringe Fluoreszenzintensität vorliegt. Nach Radikalabfang sollte das entstehende Hydroxylamino-Derivat eine Donorfunktion ausüben, wodurch die Fluoreszenzintensität ansteigen sollte. Als letzte Möglichkeit der Radikal-Detektion sollte die Einsetzbarkeit des FRET-Effekts untersucht werden. Hierfür sollte ein geeignetes Donor/Akzeptor-Paar ausgewählt werden, welche über ein Nitron verbunden werden sollten. Es bestand die Annahme, dass sich der Orientierungsfaktor κ^2 mit Änderung der Konformation der Sonde durch den Radikalabfang (Änderung der Bindungsordnung vor (C=N-Doppelbindung) und nach (C–N-Einfachbindung) Radikalabfang) ebenfalls verändern könnte. Dadurch bestand die Möglichkeit einer Veränderung der Intensität des FRET-Effektes, wodurch ein Radikalabfang signalisiert werden könnte. Laut Literatur^[65] wäre es allerdings ebenso möglich, dass der Energietransfer über die Bindungen vom Donor-Fluorophor über die Nitrongruppe zum Akzeptor-Fluorophor erfolgt. Dabei besteht die Aussicht, dass sich die Änderung der Bindungsordnung von der π -Bindung im Nitron zur σ -Bindung im Hydroxylamin auch auf den Energietransfer auswirkt.

Bei allen zu entwickelnden Sonden sollte durch geeignete Derivatisierung eine möglichst unkomplizierte Anbindung der Fänger-Einheit an das Fluorophor gewährleistet werden.

4.1.2 DIE FLUORESZENZGEBENDE KOMPONENTE

Als fluoreszenzgebende Komponente kamen grundsätzlich alle fluoreszierenden Verbindungen in Frage, die eine ausreichende Quantenausbeute in wässriger Lösung verbunden mit einer guten Membrangängigkeit aufweisen. Zudem sollten sie unter den Anwendungsbedingungen ausreichend stabil und synthetisch so funktionalisierbar sein, dass eine Anbindung der Fänger-Einheit erfolgen konnte. Aufgrund des angestrebten Einsatzes der Fluoreszenzsonden in vivo sollten neben den bereits genannten Anforderungen weitere Bedingungen erfüllt werden. Hierzu zählen neben der möglichst hohen Beständigkeit gegen Reduktionsmittel insbesondere eine Anregbarkeit im langwelligen Bereich und damit eine langwellige Emission (500-700 nm), eine große Stokessche Verschiebung sowie eine lange Fluoreszenzlebensdauer. Aufgrund der vorliegenden Eigenfluoreszenz von Serumbestandteilen resultiert eine Untergrundfluoreszenz, welche einen breiten Wellenlängenbereich umfasst. Beispielsweise emittieren Serumproteine nach Anregung bei 280 nm im Bereich von 320-350 nm. Andere Bestandteile wie NADH werden im Bereich von 330-360 nm angeregt und emittieren im Bereich von 430-470 nm. Dadurch wird die Sensitivität in diesem Bereich drastisch eingeschränkt.^[53] Eine Anregung der Fluoreszenzsonde im langwelligen Bereich (>500 nm) minimiert zudem das Risiko einer photochemischen Zellschädigung und reduziert außerdem das Auftreten der lichtinduzierten Zersetzung des Farbstoffes. Bei der Auswahl der Fluorophore lag ein besonderes Gewicht auf der kommerziellen Verfügbarkeit geeigneter Ausgangsverbindungen, welche die Möglichkeit der Derivatisierung zur Gewährleistung einer möglichst unkomplizierten Anbindung der Fänger-Einheit boten. Diese Kriterien sind für bestimmte Derivate des Phenanthridins (**3**), des Pyrens (**4**), des Anthracens (**1**) sowie Derivate aus der Gruppe der Rhodamine **5** und der BODIPY's **2** erfüllt (Abbildung 4-1).

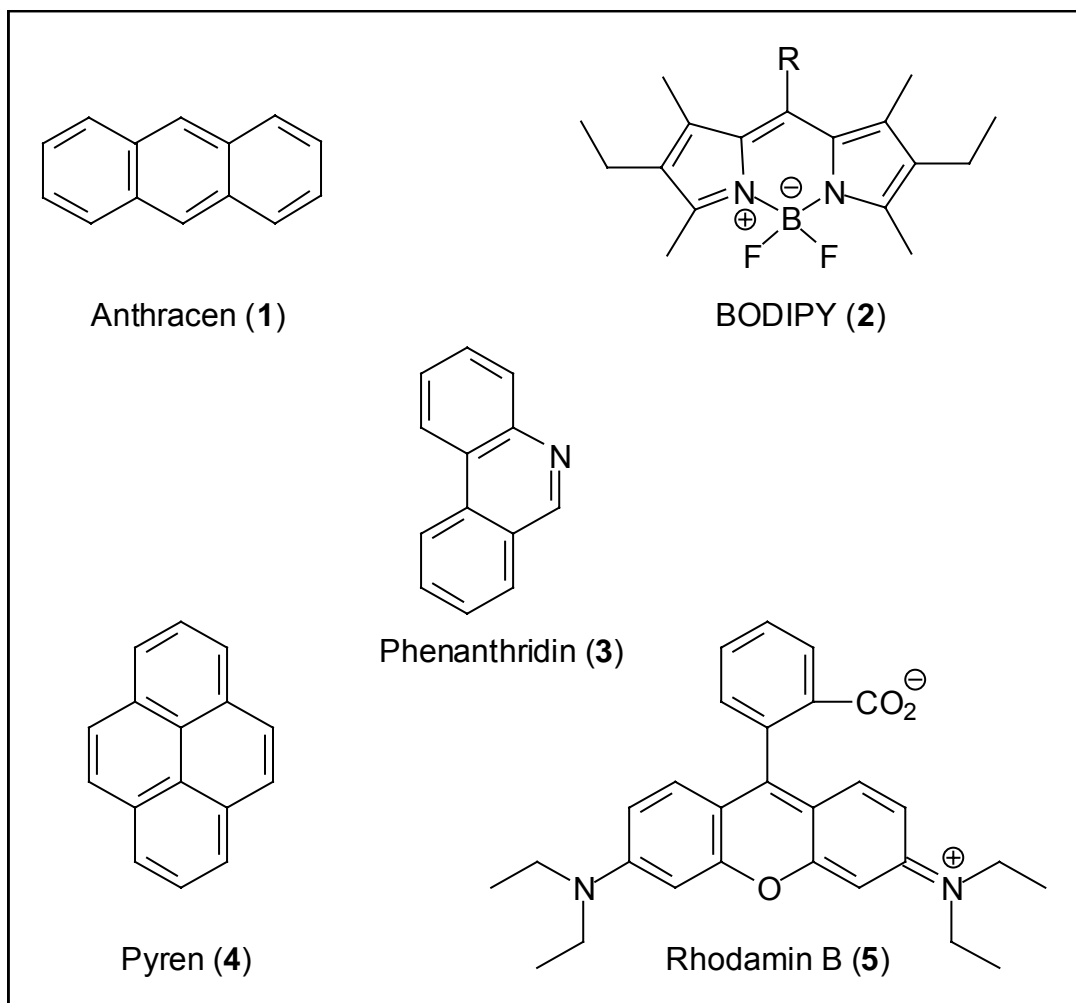


Abbildung 4-1: Strukturen der verwendeten Fluorophor-Grundkörper.

Insbesondere die Rhodamine und die BODIPY's zeichnen sich durch sehr hohe Quantenausbeuten, durch gute Photostabilität und geringe Cytotoxizität aus. In Tabelle 4-1 sind die genannten Fluorophore mit ihren Anregungs- und Emissionswellenlängen aufgeführt. Dabei gilt es zu beachten, dass durch die notwendige Derivatisierung der Fluorophor-Grundkörper diese physikalischen Eigenschaften teilweise stark beeinflusst werden können.

Tabelle 4-1: Absorptions- und Emissionsmaxima der Grundkörper der verwendeten Fluorophore.^[66]

Name	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Lösungsmittel
Anthracen (1)	251	401	Acetonitril
BODIPY 2	510-525 ^a	540-555 ^a	Methanol
Phenanthridin (3)	265	415	DMSO
Pyren (4)	350	392	n-Pentan
Rhodamin B (5)	540	625	Ethanol

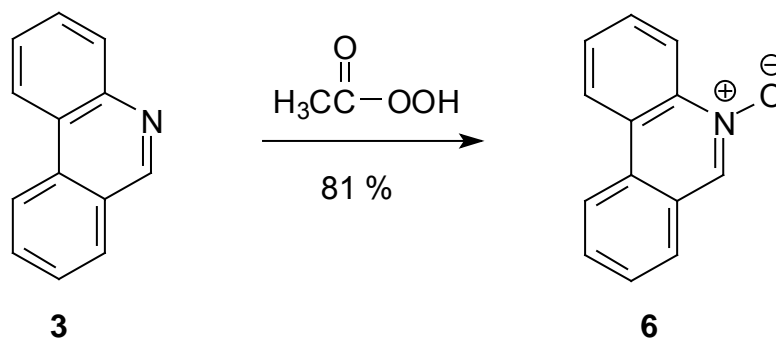
a) in Abhängigkeit des Substituenten R

Das Grundgerüst dieser Fluorophore bewirkt zudem eine ausreichende Lipophilie und damit eine gute Membranpermeabilität.

4.2 Darstellung der Fluoreszenzsonden zum Nachweis von Radikalen

Zur Detektion von Radikalen in vivo mittels Fluoreszenzspektroskopie sollten verschiedene Fluoreszenzsonden dargestellt werden, welche über unterschiedliche Mechanismen eine Änderung der Fluoreszenzintensität und/oder eine Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge bewirken könnten. Als Fänger-Einheit sollte zum einen die Nitron-Gruppe und zum anderen die Nitroso-Gruppe eingesetzt werden. Der folgende Abschnitt gibt eine Zusammenfassung der Darstellung sowie der Untersuchungsergebnisse wider. Eine ausführliche Beschreibung ist den Abschnitten 4.3 und 7.6-7.8 zu entnehmen.

Bei der Synthese von Fluoreszenzsonden mit einer Nitron-Gruppe als Fänger-Einheit sollten vier mögliche Mechanismen zur Radikal-Detektion untersucht werden. Zunächst sollte ein direkter Einbau des Nitrons in ein Fluorophor erfolgen, wodurch die Möglichkeit der Fluoreszenzlöschung nach Radikalabfang aufgrund der Unterbrechung des mesomeren Systems besteht. Durch die nötige Aufhebung der Mesomerie steigt allerdings die Energiebarriere des Radikalabfanges erheblich an, was dazu führen könnte, dass ein solches Nitron keine Fängereigenschaften besitzt. In der Literatur sind keine Untersuchungen hinsichtlich des Radikalabfanges derartiger Nitrone bekannt. Dagegen sind Reaktionen von verschiedenen Phenanthridin-N-oxid-Derivaten mit Grignard-Reagenz veröffentlicht worden, worin das N-Oxid genau wie alle anderen cyclischen und offenkettigen Nitrone unter Addition und Bildung des entsprechenden Hydroxylamins reagiert.^[67] Daher wurde für die Synthese das Phenanthridin (**3**) ausgewählt, da es kommerziell erhältlich ist und eine schnelle und einfache Derivatisierung zum Nitron **6** durch eine einstufige Oxidation mit Peressigsäure durchgeführt werden konnte.^[68] Die Darstellung des Phenanthridin-5-oxids (**6**) gelang mit einer Ausbeute von 81 %.

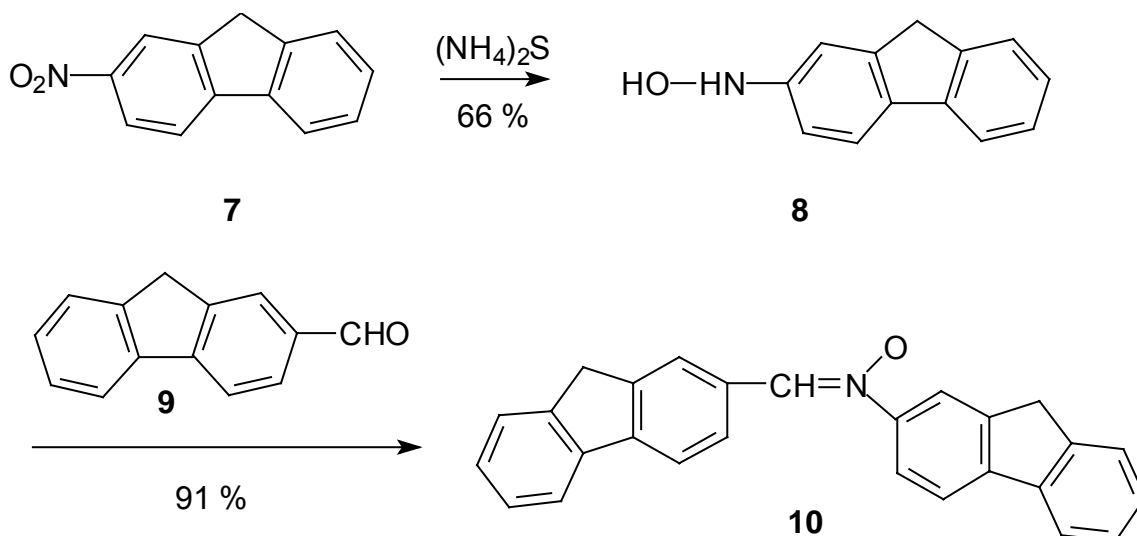


Die Untersuchung des Radikalabfanges durch das Nitron **6** mittels ESR-Spektroskopie zeigte jedoch, dass die Verbindung **6** keinerlei Radikalfänger-Qualitäten besitzt. Wie bereits erwähnt könnte dies an der Energiebarriere der Reaktion liegen, die durch die nötige Aufhebung der Mesomerie besonders hoch ist. Die direkte Einführung der Fänger-Einheit in ein mesomeres System wurde aufgrund dieser Ergebnisse nicht weiter verfolgt.

Zur Untersuchung des Einflusses der Nitron-Gruppe in direkter Anbindung an ein Fluorophor bzw. als „Brücke“ zwischen zwei Fluorophoren wurden zunächst Modellverbindungen für eine ESR und UV/Vis-spektroskopische Analyse synthetisiert. Für einen UV/Vis-spektroskopischen Vergleich sollten ebenfalls die bei einem Radikalabfang entstehenden Hydroxylaminoderivate dargestellt werden. Zur Darstellung von Nitronen existieren viele verschiedene Möglichkeiten. Die am häufigsten angewandte Synthesemethode ist die Kondensation von Aldehyden und Hydroxylaminen. Sie erfolgt zumeist leicht und in guten Ausbeuten bereits bei 20 °C in Lösungsmitteln wie Alkoholen, Ether, Dichlormethan oder Chloroform unter saurer Katalyse oder Zusatz Wasser bindender Mittel. Bei verminderter Reaktivität der Edukte aufgrund sterischer oder elektronischer Effekte kann die Reaktionstemperatur erhöht werden.

Als Modellverbindung für ein Nitron, welches an C- und N-Atom der Nitron-Gruppe ein mesomeres System trägt, wurde das Fluorenyl-(α -fluorenyl)-amin-N-oxid (**10**) gewählt. Hierfür wurde zunächst das käufliche 2-Nitrofluoren (**7**) entsprechend einer allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Darstellung aromatischer Hydroxylamine^[69] durch Reduktion mit Ammoniumsulfid bei -5 °C in das Luft- und Temperatur empfindliche 2-Hydroxylaminofluoren (**8**) überführt. Im allgemeinen bildet sich bei niedrigen Temperaturen das Hydroxylamin langsam, aber in deutlich höherer Ausbeute, wohingegen bereits bei 20 °C das entsprechende Amin als Hauptprodukt isoliert wird.^[69] Für eine erfolgreiche Synthese von Hydroxylaminen müssen daher relativ lange Reaktionszeiten in Kauf genommen werden.

Nach Kondensation des 2-Hydroxylaminofluoren (**8**) mit dem kommerziell erhältlichen Fluoren-2-carbaldehyd (**9**) wurde das Fluorenyl-(α -fluorenyl)-amin-N-oxid (**10**) in 91 proz. Ausbeute erhalten.

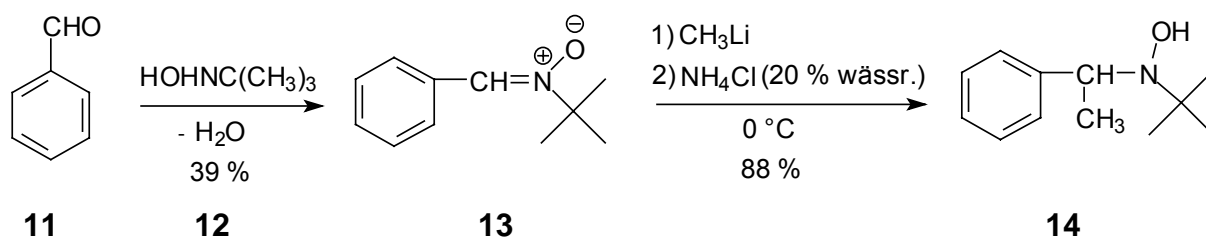


Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Nitrons **10** musste die Untersuchung einer möglichen Veränderung der Konjugation im Molekül durch Addition von Radikalen in DMSO durchgeführt werden. Hierbei ist allerdings zu bedenken, dass DMSO selbst ein gutes Target für Radikale ist, was die Ergebnisse beeinflussen könnte. Daher wurde anstelle des Fluorenyls das kleinere und damit besser lösliche Phenyl als mesomeres System am Nitron gewählt. Insgesamt sollten hierbei drei verschiedene Varianten untersucht werden:

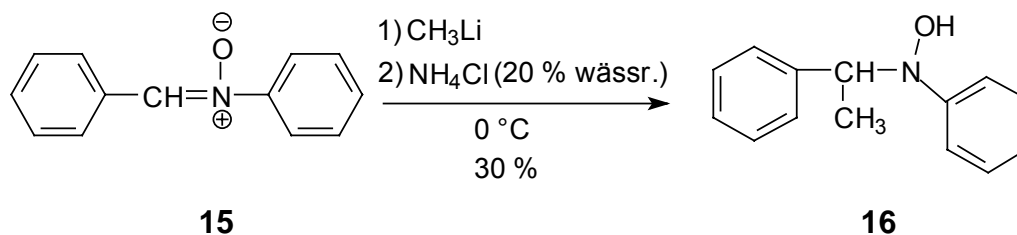
- mesomeres System am C-Atom der Nitron-Gruppe
- mesomeres System am C- und am N-Atom der Nitron-Gruppe
- mesomeres System am N-Atom der Nitron-Gruppe

Dazu sollte das jeweilige durch Abfang von Methylradikalen entstehende Hydroxylamin synthetisiert und die UV-Spektren gemessen und verglichen werden.

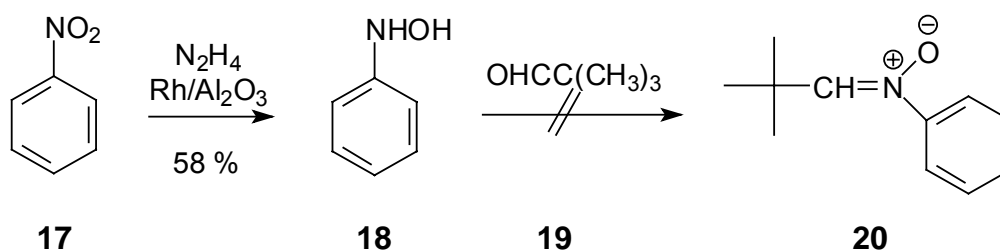
Die Darstellung des *N-tert.*-Butyl- α -phenylnitrons (**13**) (PBN) erfolgte durch Kondensation von Benzaldehyd (**11**) und *N-tert.*-Butylhydroxylamin (**12**) in 39 proz. Ausbeute. Das daraus resultierende Hydroxylamin **14** wurde durch Umsetzung mit Methyllithium und anschließender wässriger Aufarbeitung mit einer Ausbeute von 88 % erhalten.



In analoger Weise wurde das Hydroxylamin **16** aus dem käuflichen N, α -Diphenylnitron (**15**) in 30 proz. Ausbeute synthetisiert.^[70]



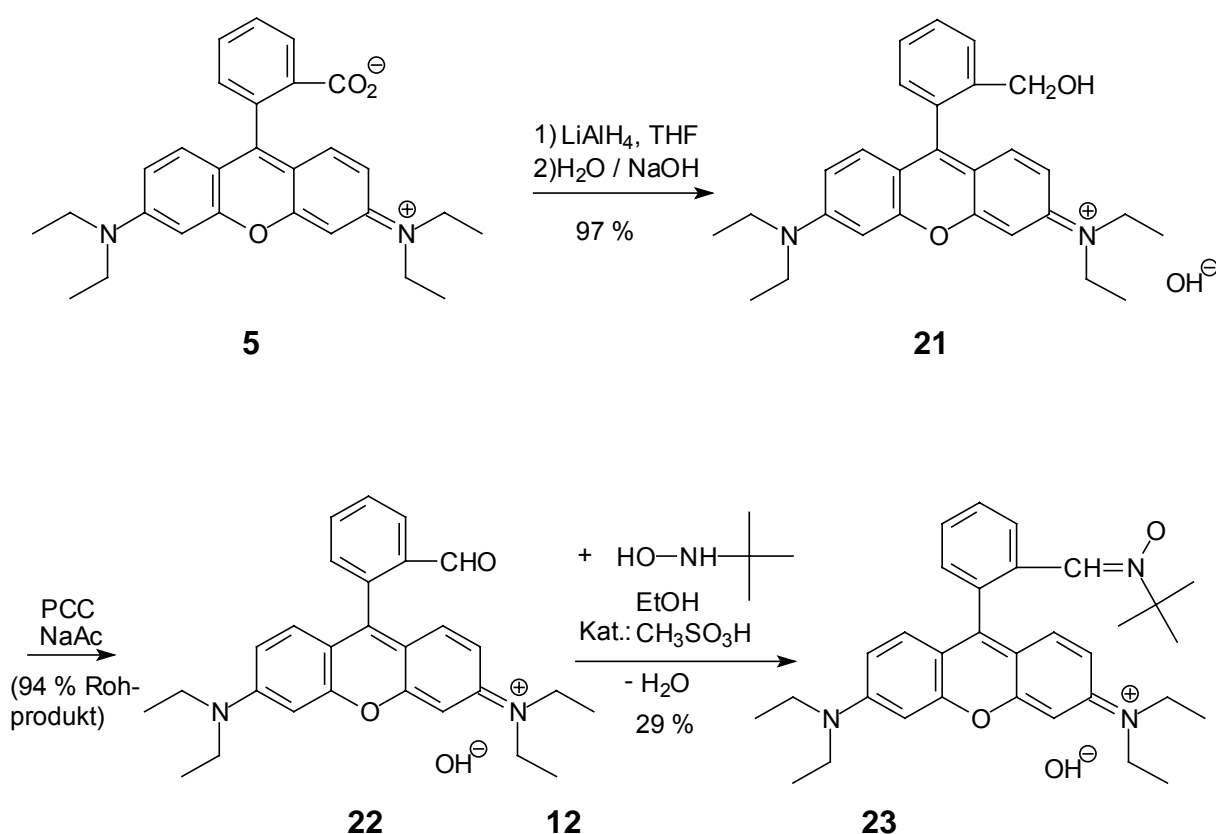
Zur Kondensation des Pivaldehyds **19** mit Phenylhydroxylamin **18** musste zunächst das Phenylhydroxylamin **18** durch katalytische Reduktion von Nitrobenzen mit Hydrazin dargestellt werden. Dies gelang mit einer Ausbeute von 58 %. Die anschließende Kondensation zum Nitron **20** konnte auch nach diversen unterschiedlichen Darstellungsversuchen nicht erfolgreich durchgeführt werden.



Daher wurden für einen Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften zunächst nur das Monoaryl- (**13**) und das Diaryl-substituierte Nitron (**15**) verwendet sowie ihre entsprechenden Hydroxylamine. Dabei zeigte sich, dass sich die UV/Vis-Spektren beider Nitrone deutlich von ihren entsprechenden Hydroxylaminen unterscheiden, so dass sich auch eine Änderung vor und nach Radikalabfang im Spektrum zeigen müsste.

Aus diesem Grund wurden nachfolgend Nitrone an Fluorophore konjugiert, um eine eventuelle Änderung auch im Fluoreszenzverhalten nachzuweisen. Für diesen Zweck sollte zunächst das Nitron **23** synthetisiert werden, in welchem das Fluorophor am C-Atom der Nitron-Gruppe konjugiert ist. Zur Darstellung der Verbindung **23** wurde die Carboxylgruppe des käuflichen Rhodamin B (**5**) zunächst mit Lithiumaluminiumhydrid zum Alkohol **21** reduziert und anschließend mit Pyridiniumchlorochromat zum Aldehyd **22** oxidiert. Da es weder durch

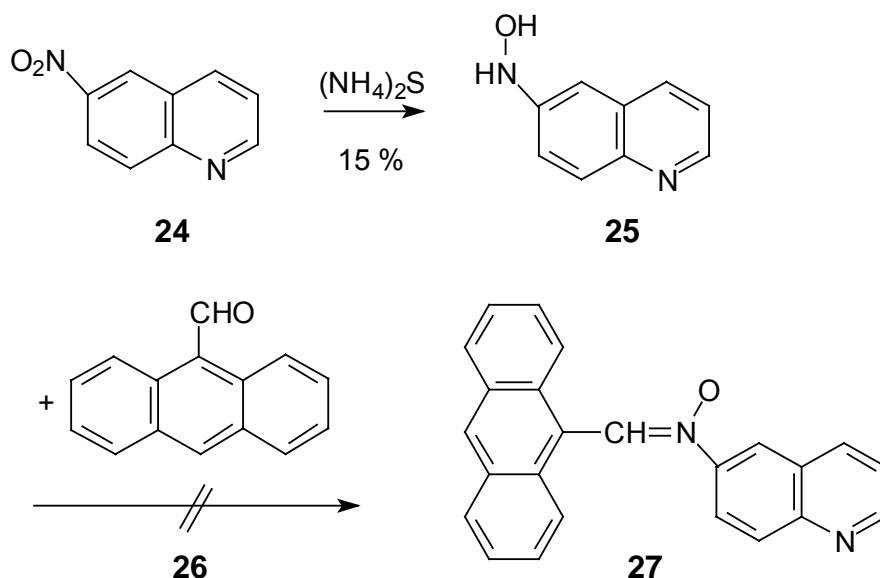
Umkristallisation noch durch Säulenchromatographie gelang, das sehr empfindliche Aldehyd **22** vollständig zu reinigen, wurde an dieser Stelle auf eine Reinigung verzichtet (Ausbeute: 94 % Rohprodukt) und die Kondensation mit *tert*-Butylhydroxylamin (**12**) zum Nitron mit dem Rohprodukt durchgeführt. Die Reinigung des Nitrons **23** gelang säulenchromatographisch an deaktiviertem neutralem Aluminiumoxid (10 % Wasser) unter Verwendung des Lösungsmittelgemisches Toluol/Ethanol (2:1 v/v). Die Ausbeute betrug 29 %.



Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zeigten, dass das Nitron **23** bereits eine sehr hohe Ausgangsfluoreszenz besitzt. Nach Abfang von Radikalen änderte sich weder die Intensität noch die Wellenlänge der Absorption oder der Emission, so dass diese Verbindung als Radikalsonde ungeeignet ist. Der geringe Einfluss des konjugierten Nitrons könnte zum einen daraus resultieren, dass der Phenylring, an welchem die Fänger-Einheit gebunden ist, nahezu senkrecht zum Fluorophor steht. Dies könnte dazu führen, dass eine Konjugation zwischen dem Ring und dem fluorophoren System nicht gegeben ist. Der geringe Einfluss der Nitron-Gruppe auf das Fluorophor könnte aber auch am Bindungsort, der *ortho*-Position im Phenylring,

liegen. Untersuchungen von Ueno et al. zum Einfluss des Photoinduzierten Elektronentransfers auf die Fluoreszenzintensität zeigten,^[71] dass dieser Effekt in Fluorescein- und BODIPY-Derivaten insbesondere bei Anbindung von Elektronen-Donatoren bzw. -Akzeptoren in para-Stellung des konjugierten Phenylrings auftritt. Dieser Ansatz wurde mit der Verbindung **38** weiter verfolgt.

Als Beispiel für ein Nitron mit jeweils einem Fluorophor an C- und N-Atom der Nitron-Gruppe sollte die Verbindung **27** synthetisiert werden. Hierbei ist die Fänger-Einheit sowohl am Kohlenstoffatom als auch am Stickstoffatom direkt an das mesomere System gebunden. Für die Kondensationsreaktion zum Nitron musste zunächst das 4-Hydroxylaminochinolin (**25**) nach einer allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Synthese von Arylhydroxylaminen dargestellt werden.^[69] Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Chloroform/Methanol = 25 : 1) verfolgt, wobei deutlich wurde, dass mit dem gewünschten Produkt auch eine gleichzeitige Bildung des Amins erfolgt. Mit Erniedrigung der Temperatur nimmt das Verhältnis dieser Produkte zugunsten des Hydroxylamins **25** zu. Allerdings konnte das Verhältnis von Hydroxylamin zu Amin nur bis auf einen Wert von 7 : 1 optimiert werden. Die nachfolgende Kondensation des Hydroxylamins **25** mit dem kommerziell erhältlichen 9-Anthracenaldehyds (**26**) gelang trotz mehrfacher Syntheseveruche unter verschiedenen Reaktionsbedingungen nicht. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das Aldehyd **26** aufgrund sterischer Hinderung bei Kondensationen unter den hier vorliegenden Bedingungen nicht reaktiv genug ist, um mit dem Hydroxylamin zu reagieren.



Bei Erhöhung der Reaktionstemperatur bildete sich lediglich das Azoxychinolin. Das Aldehyd (**26**) konnte dagegen ohne Veränderung wieder vollständig isoliert werden. Hier scheint aufgrund der hohen Temperatur die Bildung der Azoxyverbindung aus dem Hydroxylamin **25** schneller abzulaufen als die Kondensation, wobei das 4-Hydroxylaminochinolin (**25**) vollständig verbraucht wird. Hydroxylamine sind im Allgemeinen instabil, da sie eine Zwischenstufe auf dem Weg der Reduktion von Nitro- zu Aminoverbindungen darstellen. Sie neigen zur Disproportionierung, wodurch aus Nitroso- und Hydroxylaminoverbindung die Azoxyverbindung entsteht (Abbildung 4-2).

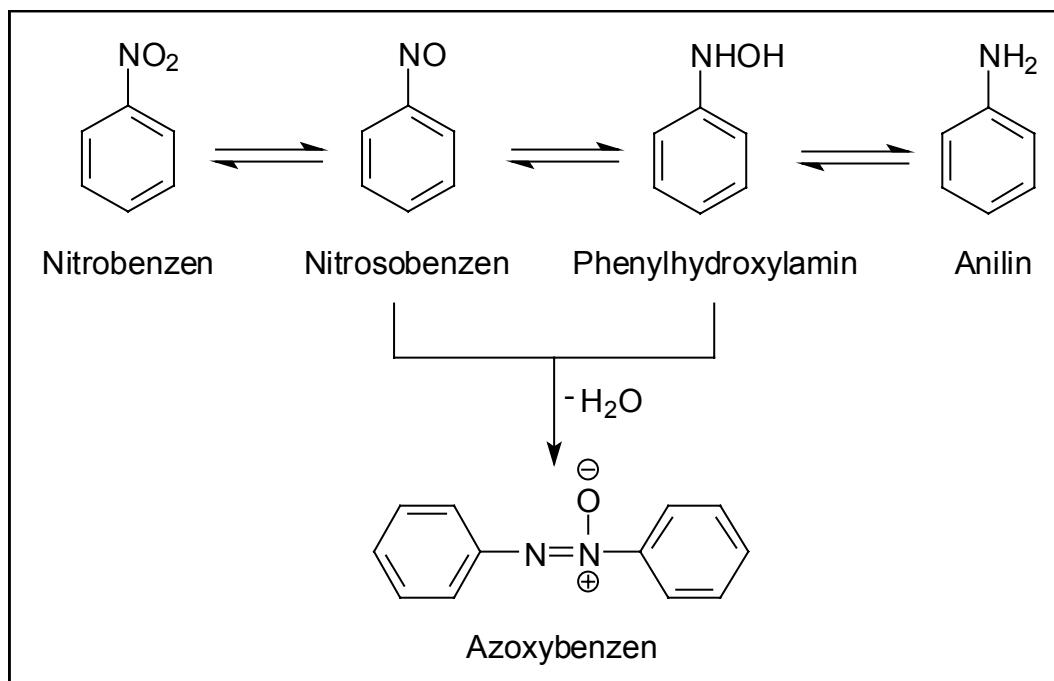
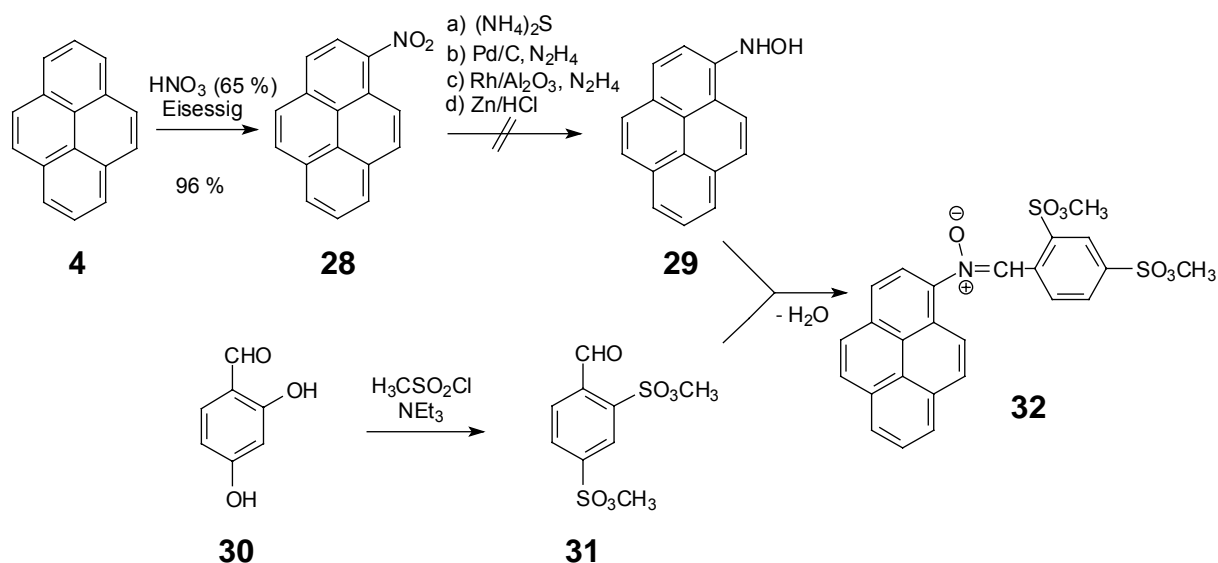


Abbildung 4-2: Entstehung der Azoxyverbindung am Beispiel des Azoxybenzens.^[72]

Die Disproportionierung kann allerdings bei tiefen Temperaturen weitestgehend unterdrückt werden. Aufgrund der hier jedoch vorliegenden geringen Reaktivität des Aldehyds (**26**) fand eine Reaktion bei niedrigen Temperaturen nicht statt.

Aufgrund dieser Befunde wurde die Verwendung des Anthracenaldehyds als Fluorophor eingestellt. Stattdessen wurde eine Synthese entwickelt, die eine Verwendung des Pyrens (**4**) als Fluorophor ermöglichte. Dabei war zu beachten, dass das Pyren zwar aufgrund seines großen mesomeren Systems eine starke Lipophilie besitzt und somit membrangängig ist, dieses aber auch eine sehr schlechte Löslichkeit in den für die zellulären Untersuchung nötigen wässrigen Systemen mit sich bringt. Daher sollten Sulfonsäureestergruppen in das Pyren-Nitron **32** eingebaut werden, was durch die Methylsulfonierung^[73] von käuflichem 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**30**) und anschließender Kondensation mit 1-Hydroxylaminopyren (**29**) realisiert werden sollte. Die konvergente Synthese des Nitrons **32** scheiterte jedoch an der Darstellung des 1-Hydroxylaminopyrens (**29**). Es bildete sich bei den verschiedensten Darstellungsversuchen mit Variation von Lösungsmitteln und Katalysatoren lediglich rotes Azoxypyren, was aus dem 1-Hydroxylaminopyren (**29**) durch Disproportionierung entsteht (siehe Abbildung 4-2). Laut Literatur^[74] ist es nicht möglich, das Hydroxylamin **29** zu isolieren, da es extrem

instabil ist und sofort in Lösung disproportioniert. Unter anderem wurde hier das 1-Hydroxylaminopyren (**29**) in alkoholischer Lösung durch Reduktion von Nitropyren (**28**) dargestellt und – da die Isolierung nicht gelang – mit Benzaldehyd versetzt, um ein stabileres Abfangprodukt, das Nitron, zu bilden. Dies gelang jedoch ebenfalls nicht. Es wurde lediglich aus dem bei der Reduktion gleichfalls entstehenden 1-Aminopyren das entsprechende Imin gebildet. Die Darstellung eines pyrenhaltigen Nitrons mit dem Fluorophor am Stickstoff-Atom wurde daher eingestellt.



Im allgemeinen birgt die Darstellung von mehrkernigen aromatischen Hydroxylaminen Schwierigkeiten, da sie eine noch stärkere Neigung zur Disproportionierung haben als die einkernigen aromatischen Hydroxylamine. Aufgrund dessen wurde nach einem Fluorophor gesucht, in welchem die Möglichkeit besteht, die Hydroxylaminogruppe an einem einkernigen Aromaten einzuführen, wo sie aber auch gleichzeitig noch in Konjugation zum fluorophoren System steht. Diese Bedingungen scheinen in den Bor-dipyrromethenen, den sogenannten BODIPY's, gegeben zu sein. Als Fluorophor wurde ein 8- oder *meso*-substituiertes Bor-dipyrromethen-Derivat (BODIPY) gewählt, welches sich durch hohe Quantenausbeuten und Absorption im langwelligen Bereich ($\lambda_{\text{abs}} > 500 \text{ nm}$) auszeichnet. Die Anbindung des Fluorophors an das Stickstoff-Atom des Nitrons erfolgt über einen Benzolring.

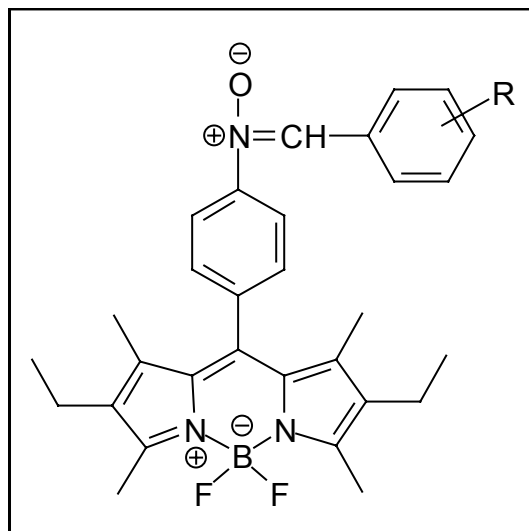
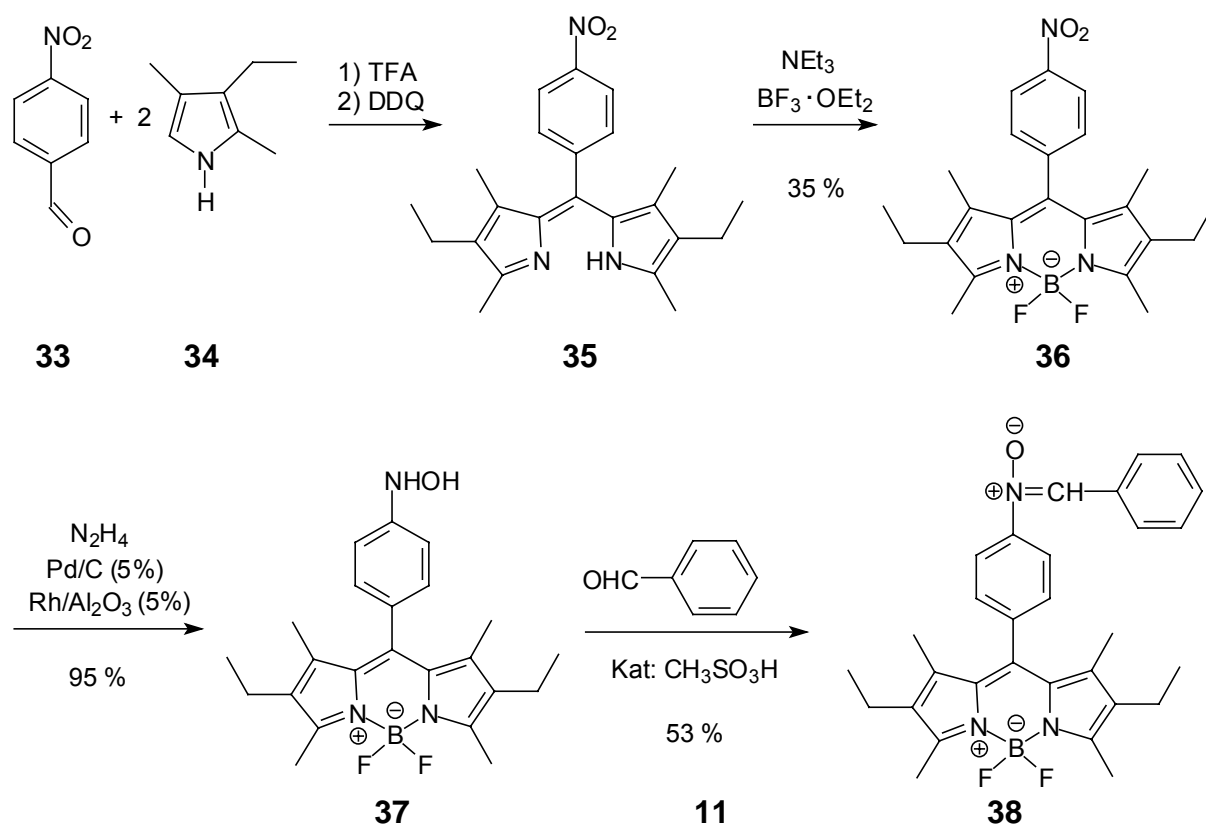


Abbildung 4-3: Struktur eines Nitrons mit einem Bor-dipyrrromethen-Derivat (BODIPY) als Fluorophor.

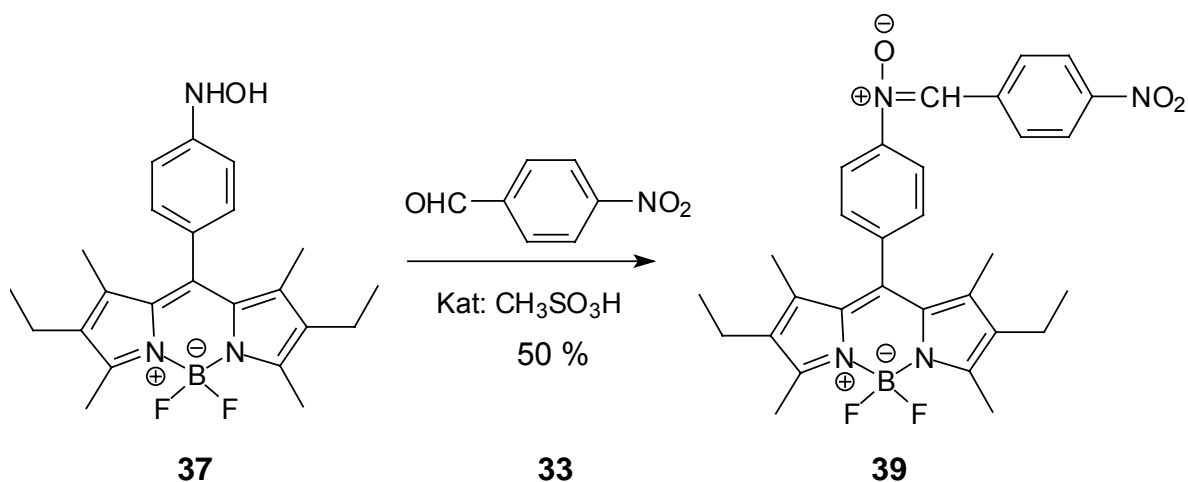
Es besteht die Annahme, dass aufgrund der zunächst vorliegenden Nitron-Einheit, welche als Elektronen-Akzeptor fungiert, eine geringe Fluoreszenzintensität vorliegt. Nach Radikalabfang sollte das entstehende Hydroxylamin eine Donorfunktion ausüben, wodurch die Intensität der Fluoreszenz ansteigen sollte. Dieses Verhalten beruht laut Literatur^[75] auf der Tatsache, dass der Prozess des Charge Transfers in 8-Anilino-substituierten BODIPY's ungewöhnlich empfindlich auf eine Änderung der Elektronen-Donor-Stärke der in meso-Position vorliegenden Gruppe reagiert. Zur Verstärkung dieses Effektes besteht zusätzlich noch die Möglichkeit der Einführung elektronenziehender Gruppen in *para*- oder in *ortho*- und *para*-Position (R, Abbildung 4-3).

Die lineare Synthese des Fluoreszenzindikators **38** ging von den käuflichen Verbindungen *p*-Nitrobenzaldehyd (**33**) und 2,4-Dimethyl-3-ethylpyrrol (**34**) aus. Nach einer säurekatalysierten elektrophilen Substitution des Aldehyds **33** am Pyrrol **34** findet eine weitere, ebenfalls durch Trifluoressigsäure katalysierte elektrophile Substitution an einem zweiten Pyrrol-Molekül durch das entstandene Acyl-Pyrrol statt. Die durch die anschließende Oxidation mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) entstehende Verbindung **35** wird ohne vorherige Isolierung basenkatalysiert mit Bortrifluorid-Etherat zum Nitro-BODIPY^[76] **36** umgesetzt. Die nachfolgende Reduktion zum Hydroxylamino-BODIPY **37** erfolgte unter Verwendung von Hydrazin-Monohydrat als Reduktionsmittel und einem Gemisch aus Palladium auf Aktivkohle und Rhodium auf Aluminiumoxid im Verhältnis 1:1 als Katalysator. Die

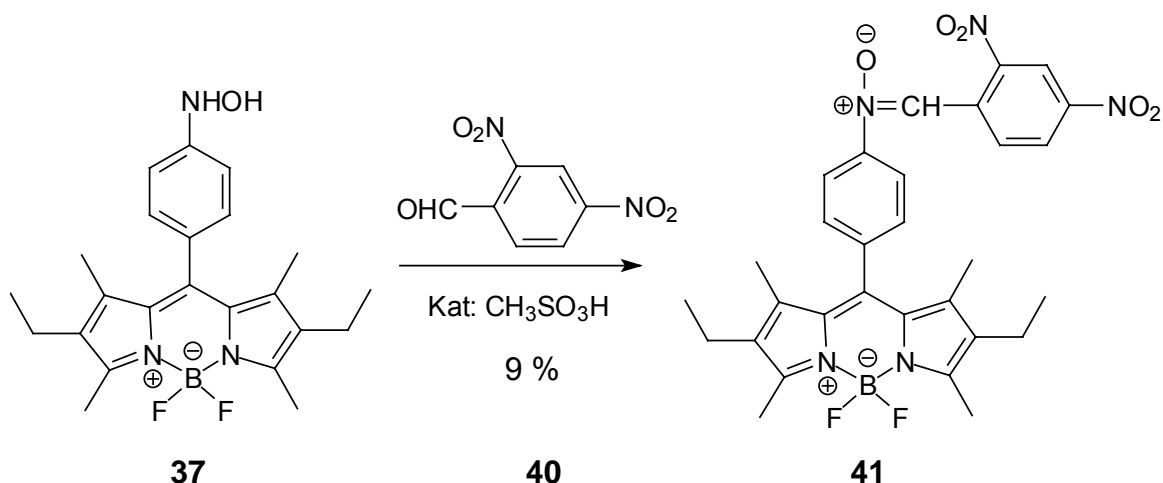
anschließende Kondensation mit Benzaldehyd (**A6**) zum Nitron **38** gelang mit einer Ausbeute von 53 %.



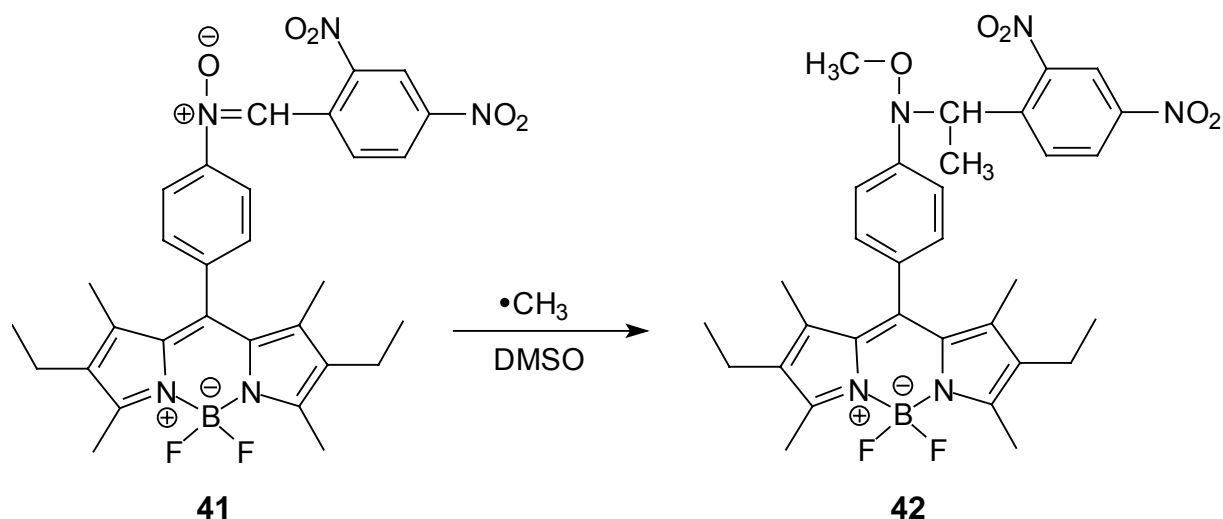
Es zeigte sich, dass bei der Reaktion der Fluoreszenzsonde **38** mit Radikalen weder eine Änderung der Fluoreszenzintensität noch der Absorptions- bzw. Emissionswellenlänge eintritt. Das Nitron **38** hat bereits eine sehr hohe Fluoreszenzintensität. Dies könnte darin begründet sein, dass die Nitron-Gruppe als Elektronen-Akzeptor zu schwach ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte in *para*-Stellung als Elektronen ziehende Gruppe die Nitrogruppe eingeführt werden. Die Synthese ging von dem Hydroxylamin **37** aus. Dieses wurde mit dem käuflichen *para*-Nitrobenzaldehyd (**33**) in einer Kondensationsreaktion säurekatalytisch zum Nitron (**39**) umgesetzt. Die Ausbeute betrug 50%.



Die Verbindung **39** zeigte jedoch eine ähnlich hohe Fluoreszenz wie Verbindung **38**. Die Reaktion mit Radikalen erbrachte ebenfalls keine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften. Daher wurden die Elektronen ziehenden Gruppen sowohl in *para*- als auch in *ortho*-Stellung eingefügt. Die Synthese des Nitrons **41** gelang mit einer Ausbeute von 9 % durch Kondensation des käuflichen 2,4-Dinitrobenzaldehyds (**40**) mit dem Hydroxylamin **37**.



Eine Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften zeigte, dass die Fluoreszenzintensität nahezu gelöscht ist, während die Absorptions- und Emissionswellenlängen bestehen bleiben. Der Abfang von Radikalen durch die Fluoreszenzsonde **41** resultiert erwartungsgemäß in einem Anstieg der Fluoreszenz durch Bildung des entsprechenden Hydroxylamins. Zur Ermittlung der Fluoreszenzeigenschaften des Methylhydroxylamins **42** wurde das Nitron **41** mit Methylradikalen umgesetzt. Die Radikalerzeugung erfolgte über die Fenton-Reaktion (Nitron **41**/Wasserstoffperoxid/Eisen(II)-chlorid = 1/30/30) in DMSO. Die Ausbeute betrug 61 %.



Das Hydroxylamin **42** zeigte eine vorteilhafte Anregbarkeit im langwelligen Bereich ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 548 \text{ nm}$ in xxx) sowie eine gute Photostabilität und eine ausreichend hohe Quantenausbeute in wässriger Lösung.

Die Untersuchung einer möglichen Anwendung des FRET-Effektes zur Radikal-Detektion sollte mit dem Donor/Akzeptor-Paar BODIPY/Rhodamin erfolgen, welche über ein Nitron verbunden werden sollten. Durch Änderung der Bindungsordnung vor (π -Bindung) und nach (σ -Bindung) Radikalabfang bestand die Annahme, dass sich der Orientierungsfaktor κ^2 mit Änderung der Konformation der Sonde ebenfalls verändern könnte. Dadurch bestand die Möglichkeit einer Veränderung der Intensität des FRET-Effektes, wodurch ein Radikalabfang signalisiert werden könnte. Es wäre allerdings auch möglich, dass der Energietransfer über die Bindungen vom Donor-Fluorophor über die Nitrongruppe zum Akzeptor-Fluorophor erfolgt.^[65] Durch die Änderung der Bindungsordnung könnte sich auch dies auf den Energietransfer auswirken. Als Donor-Fluorophor sollte das 4,4-Difluoro-8-(4-hydroxylaminophenyl)-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**37**) dienen, welches bei 520 nm effizient angeregt werden kann und bei 544 nm emittiert. Die spektrale Überlappung $J(\lambda)$ zwischen der Emission des BODIPY **37** und der Absorption des Rhodamins **5** liegt bei 530-590 nm (Abbildung 4-4).

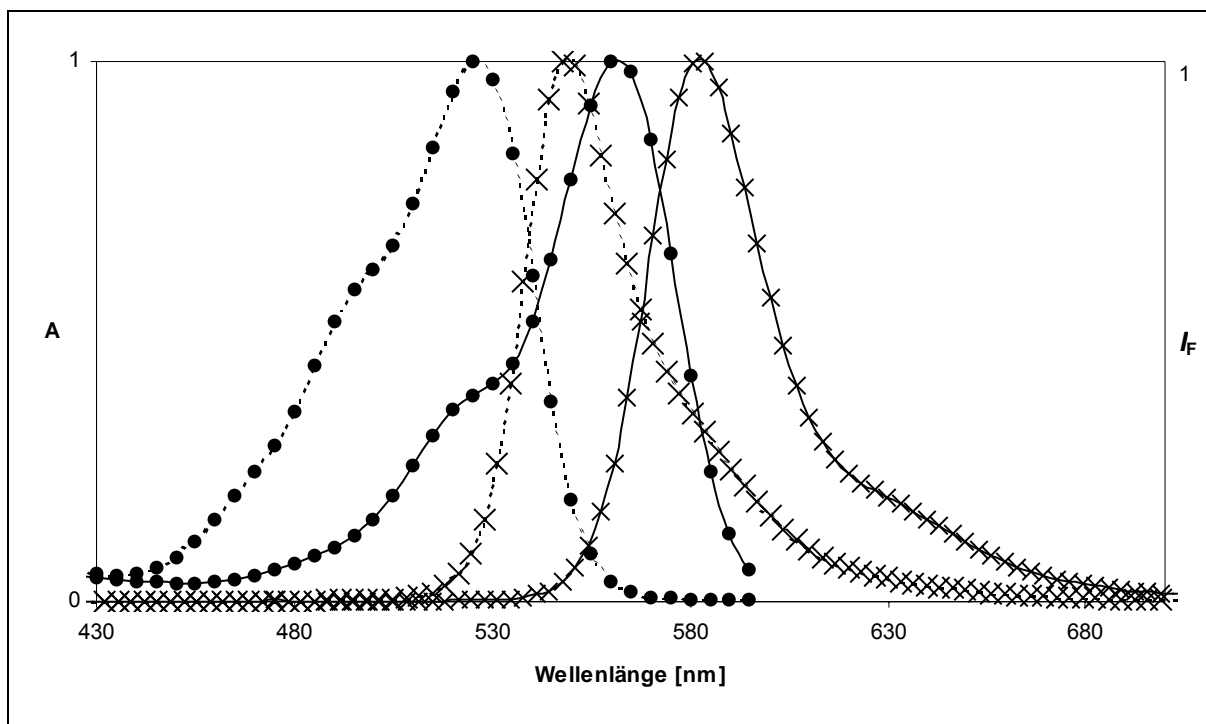
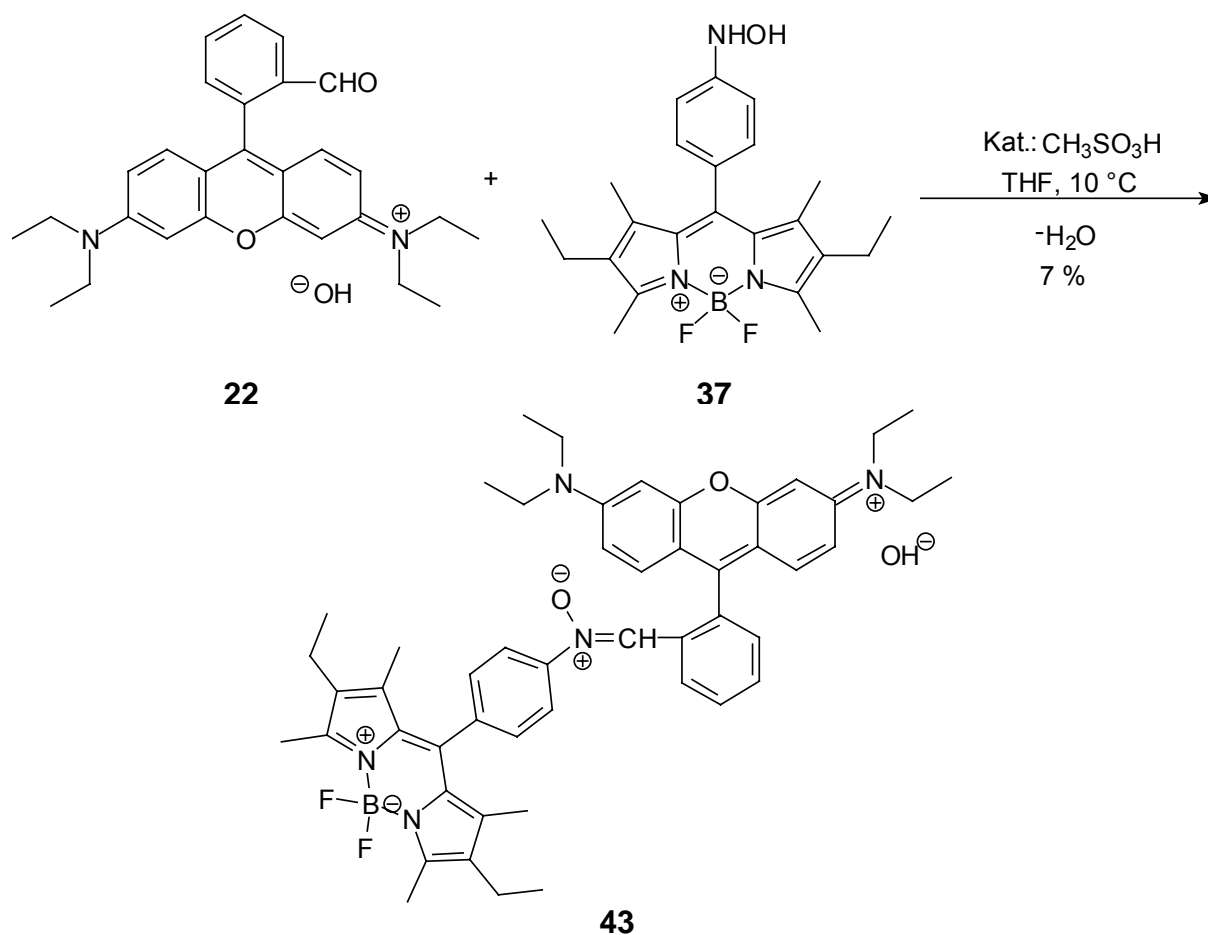
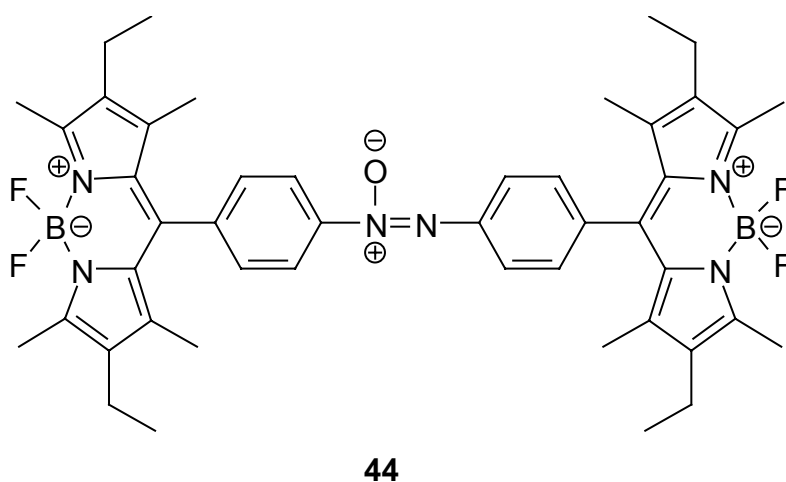


Abbildung 4-4: Absorptions- (---) und Emissionsprofile (—) des BODIPY's **37** (•) als Donor und des Rhodamins B **5** (x) als Akzeptor. A = normalisierte Absorption, I_F = normalisierte Fluoreszenz.

Die Synthese des Nitrons **43** gelang durch Kondensation des BODIPY-Hydroxylamins **37** mit dem Rhodamin B-Aldehyd **22**.



Hierbei handelt es sich jedoch nur um die Nebenreaktion der Bildung der Azoxyverbindung **44** aus dem Hydroxylamin **37**, was anhand der Ausbeute von 7 % deutlich wird. Wegen der starken sterischen Hinderung des Aldehyds müsste die Reaktion bei höheren Temperaturen durchgeführt werden. Dieses verbietet sich allerdings aufgrund der dadurch noch stärker bevorzugten Bildung der Azoxy-Verbindung **44**.

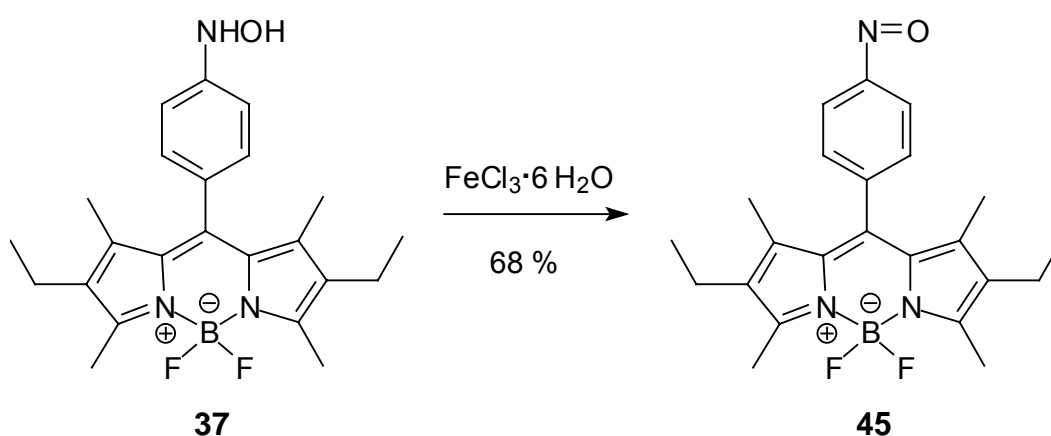


Eine Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften des Nitrons **43** zeigte, dass durch einen Radikalabfang weder eine Fluoreszenzerniedrigung bzw. -löschung noch eine

ausreichende Verschiebung (> 50 nm) der Absorptions- bzw. Emissionswellenlänge erfolgt (ausführliche Beschreibung siehe Abschnitt 4.3.9.2). Sowohl vor als auch nach Abfang von Radikalen war lediglich die Absorptions- und Emissionswellenlänge des BODIPY-Fluorophors sichtbar. Dagegen konnte die Emissions-Wellenlänge des Rhodamins (als Akzeptor, $\lambda_{\text{exc}} = 555$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 584$ nm) nicht beobachtet werden. Eine mögliche Ursache dafür, dass die Fluoreszenzspektren des Nitrons **43** vor und nach Radikalabfang nur eine geringfügige Änderung der Intensität aufweisen, könnte an der C-Anbindung der Nitron-Gruppe an das Rhodamin (*ortho*-Position) liegen. In dieser Position könnte ein zu geringer Einfluss auf das fluorophore System (Rhodamin) herrschen, so dass eine Energieübertragung über PET nicht möglich ist. Ein Energieaustausch zwischen beiden Fluorophoren über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (FRET) scheint ebenfalls weder vor noch nach Radikalabfang stattzufinden. Damit ist das Nitron **43** als Sonde zur Detektion von Radikalen ungeeignet.

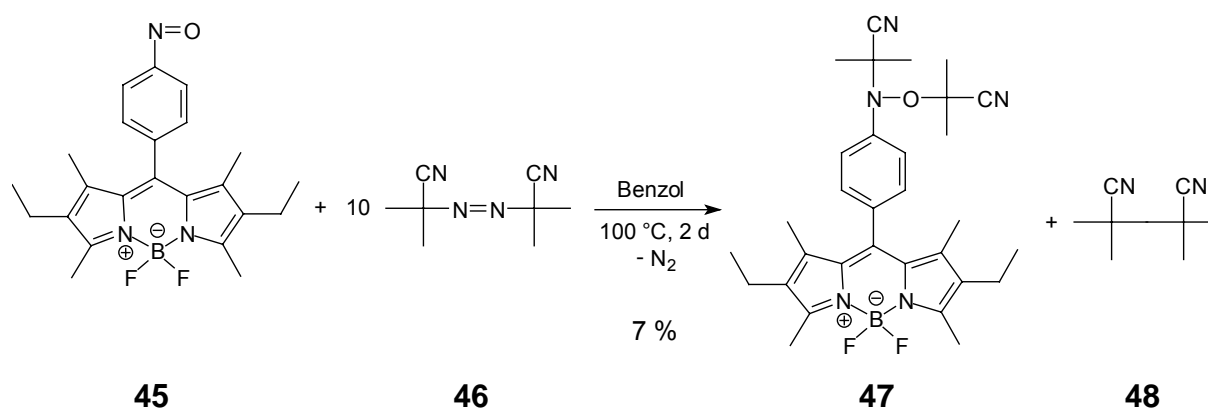
Neben den Nitronen sollte auch eine Fluorophor-Nitrosoverbindung synthetisiert werden, da Nitrosoverbindungen dafür bekannt sind, effektiver als Nitron-Radikale abzufangen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Nitrosoverbindung aufgrund ihres Charakters als Elektronenakzeptor die Fluoreszenz des direkt angeschlossenen Fluorophors erniedrigt. Nach Radikalabfang könnte das entstehende Hydroxylamin als Donator die Fluoreszenzintensität erhöhen. Allerdings ist die Reduktionsempfindlichkeit der Nitroso-Gruppe höher als die der Nitron-Gruppe, was zu Schwierigkeiten hinsichtlich des durch Reduktion und nicht durch Radikalabfang entstehenden fluoreszierenden Hydroxylamins führen kann. Als fluoreszenzgebende Komponente wurde das bereits bei den Nitronen bewährte *meso*-substituierte Bor-dipyrrromethen-Derivat gewählt. Die Anbindung des Fluorophors an das Stickstoff-Atom der Nitrosogruppe erfolgt auch hier über den Benzolring. Die Synthese konnte wiederum vom Hydroxylamin **37** ausgehen. Durch die schonende Oxidation des Hydroxylamino-BODIPY **37** mit Eisen(III)-chlorid konnte das Nitroso-BODIPY **45** erfolgreich synthetisiert werden. Nitrosoverbindungen sind wie die Hydroxylamine im Allgemeinen instabil, da sie eine Zwischenstufe auf dem Weg der Reduktion von Nitro- zu Aminoverbindungen darstellen. Sie neigen zur Disproportionierung, wodurch aus Nitroso- und Hydroxylaminoverbindung – wie in Abbildung 4-2 gezeigt –

die Azoxyverbindung entsteht. Da die Disproportionierung wie bereits erwähnt bei tiefen Temperaturen weitestgehend unterdrückt werden kann, wurde die Oxidation mit Fe(III)Cl_3 zur Nitrosoverbindung **45** bei 0 °C durchgeführt. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels DC und ESI-TOF-MS. Das NMR zeigte im Rohprodukt neben der Nitrosoverbindung die Azoxyverbindung mit einem Anteil von 20 %. Die Trennung beider Substanzen gelang nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel mit Dichlormethan bei 0°C. Die Ausbeute an 4,4-Difluoro-8-(4-nitrosophenyl)1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**45**) betrug 68 % der Theorie.



Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung zeigte wie erwartet eine sehr niedrige Fluoreszenzintensität. Nach Radikalabfang konnte durch Entstehung des entsprechenden Hydroxylamins eine Intensitätszunahme gezeigt werden.

Zur Ermittlung der Fänger-Qualität der Radikalsonde **45** wurde eine Kalibrierungsgerade des Abfangproduktes benötigt. Zu diesem Zweck wurde das Hydroxylamin **47** des Abfanges von *tert*-Butyronitrilradikalen dargestellt. Die Synthese erfolgte im präparativen Maßstab in Anlehnung an die bei der spektroskopischen Untersuchung angewandten Bedingungen. Die Nitrosoverbindung **45** wurde mit *tert*-Butyronitrilradikalen umgesetzt, wobei die Radikalerzeugung durch thermische Zersetzung von Azoisobutyronitril (**46**) (AIBN) erfolgte. Um eine vollständige Reaktion der Sonde **45** zum Hydroxylamin **47** zu gewährleisten, wurde ein 10facher Überschuss an AIBN eingesetzt. Die Ausbeute an Hydroxylamin betrug 7 %. Neben dem gewünschten Produkt **47** entstand bei dieser Reaktion ausschließlich das 2,2,3,3-Tetramethylsuccinonitril (**48**), was NMR-spektroskopisch nachgewiesen wurde.

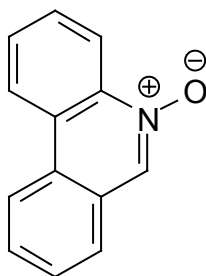


Mittels vorstehend beschriebener Methoden war es somit gelungen, die potentiellen Radikalsonden 4,4-Difluoro-8-[4-(2,4-dinitrophenylnitrono)phenyl]1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**DNBDP**, **41**) und 4,4-Difluoro-8-(4-nitrosophenyl)1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**BDPNO**, **45**) erfolgreich zu synthetisieren. Alle Verbindungen wurden mittels üblicher Analysemethoden eindeutig identifiziert. Die entsprechenden Ergebnisse sind im experimentellen Teil dieser Abhandlung nachzulesen. Die isolierten Verbindungen **41** und **45** können im festen Zustand bei Temperaturen zwischen $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Lichtausschluss über einen längeren Zeitraum ($>$ sechs Monate) ohne Zersetzungerscheinungen gelagert werden. In Lösung ist Verbindung **45** über einen Zeitraum von 16 h stabil (Disproportionierung).

4.3 Untersuchung der potentiellen Fluoreszenzsonden im chemischen System

Zunächst waren die physikalischen Eigenschaften der synthetisierten Verbindungen **6**, **10**, **13**, **23**, **38**, **39**, **41**, **45**, **43** sowie des kommerziell erhältlichen N, α -Diphenylnitrons (**15**) im chemischen System zu analysieren. Untersucht wurde der Radikalabfang mittels ESR-Spektroskopie und/oder durch Umsatz des jeweiligen Nitrons mit Radikalen im präparativen Maßstab. Des weiteren wurden die UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften in Ab- und Anwesenheit von Radikalen ermittelt. Ferner wurden die von den Nitronen **13**, **15** und **41** sowie von der Nitroso-Verbindung **45** als Abfangprodukt von Radikalen entstehenden Hydroxylamine **14**, **16**, **42** und **47** UV/Vis- bzw. fluoreszenzspektroskopisch untersucht und mit den entsprechenden Nitronen verglichen. Aufgrund des reduktiven Milieus vitaler Zellen wurden zudem Untersuchungen in Anwesenheit von Reduktionsmitteln wie NADH, Glutathion, Glucose und Ascorbinsäure durchgeführt.

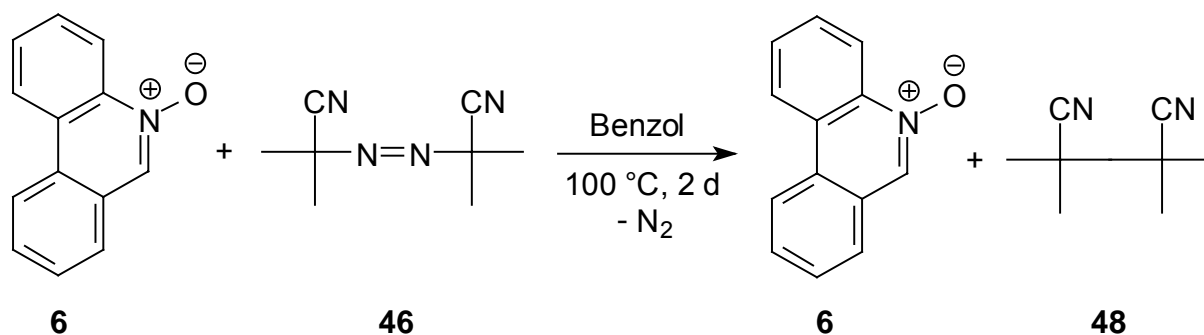
4.3.1 PHENANTRIDIN-5-OXID (**6**)



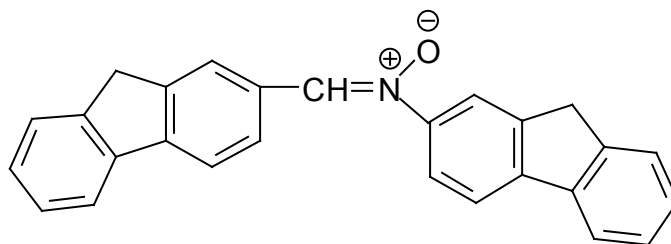
4.3.1.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Die Eignung des Nitrons (**6**) als Radikalfänger für Hydroxyl- und Superoxid-Radikale wurde zunächst mittels ESR-Spektroskopie in Wasser/THF- bzw. Wasser/DMSO-Mischungen (1:1 und 1:5 v/v) untersucht. Die Erzeugung der OH-Radikale erfolgte über die Fenton-Reaktion. Dabei wurde ein Verhältnis von Nitron (**6**) (1 mM) : Wasserstoffperoxid : Eisen(II)chlorid = 10:1:1 und 10:10:1 gewählt, um eine ausreichende Menge an Hydroxylradikalen zu erzeugen. Die Superoxid-Radikale wurden durch Zusatz von Kaliumsuperoxid (KO_2) zur Lösung von 1 mM des Nitrons

(6) in THF bzw. DMSO erzeugt (~200facher Überschuss). Die ESR-spektroskopischen Messungen zeigten jedoch weder bei Zugabe einer Hydroxylradikalquelle noch bei der Zugabe von Superoxid das Auftreten eines paramagnetischen Spin-Addukts. Dies deutet darauf hin, dass das Nitron (6) als Radikalfänger ungeeignet ist. Da aber auch die verwendeten Lösungsmittel gute Targets für Radikale sind, aufgrund der schlechten Löslichkeit des Nitrons (6) aber nicht zu ersetzen waren, wurde zur Absicherung dieses Ergebnisses die Abfangreaktion von 2-Cyano-2-propylradikalen (Isobutyronitril-Radikalen) im präparativen Maßstab in Benzol durchgeführt. Dazu wurde ein 10facher Überschuss an AIBN mit dem Nitron (6) bei 100 °C zwei Tage erhitzt. Die Reaktionskontrolle erfolgte NMR-spektroskopisch (200 MHz) in CDCl_3 . Neben den unverändert vorliegenden Signalen des Nitrons (6) erschien ein neues Signal bei 1.545 ppm (Singulett). Dieses Signal konnte dem Produkt der Rekombination zweier Isobutyronitril-Radikale, dem 2,2,3,3-Tetramethylsuccinonitril (48), zugeordnet werden. Nach Umkristallisation des durch Verdampfung der Reaktionslösung erhaltenen Feststoffes konnte das 2,2,3,3-Tetramethylsuccinonitril (48) isoliert werden. Aus dem Filtrat der Umkristallisation konnte das Nitron (6) unverändert zurück gewonnen werden.



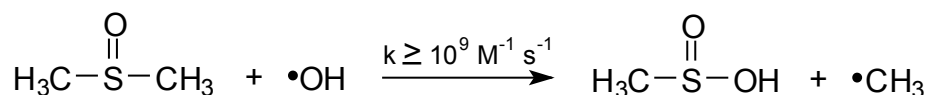
Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass vermutlich aufgrund einer hohen Energiebarriere der Radikalabfang-Reaktion (durch die nötige Aufhebung der Mesomerie) das Nitron 6 keine Radikalfänger-Qualitäten besitzt. Die direkte Einführung der Fänger-Einheit in ein mesomeres (resonanzstabilisiertes) System wurde aufgrund dieser Ergebnisse nicht weiter verfolgt.

4.3.2 FLUORENYL-(α -FLUORENYL)-AMIN-N-OXID (**10**)


4.3.2.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Zur Ermittlung der Radikalfänger-Qualität des Nitrons **10** wurde es mit OH-Radikalen und mit Superoxid umgesetzt und mittels ESR-Spektroskopie untersucht. Die Erzeugung der Hydroxylradikale erfolgte über die Fenton-Reaktion. Es wurden jeweils 1 mM Stammlösungen des Nitrons **10** in DMSO, Fe(II)-chlorid in Wasser und Wasserstoffperoxid in Wasser verwendet. Das Verhältnis bei den Messungen betrug jeweils Nitron **10** : H₂O₂ : Fe(II) = 10:10:1. Mit OH-Radikalen wurden drei ESR-Signale mit sehr geringer Intensität erhalten, die auf ein Spin-Addukt des Nitrons hindeuten. Aufgrund der geringen Intensität ist jedoch keine eindeutige Identifizierung der Spezies möglich.

Durch Zugabe von Superoxid-Radikalen (Kaliumsuperoxid) wurde ebenfalls nur ein sehr undeutliches Signal erhalten, welches keine gesicherten Rückschlüsse auf die Art des Spin-Addukts erlaubt. Das entstehende Nitroxid könnte sehr reaktiv sein und/oder die geringe Signalintensität ist auf das Lösungsmittel zurückzuführen. Die Schwierigkeit bei den Messungen bestand in der extremen Unlöslichkeit von Verbindung **10**, weshalb nur DMSO als Lösungsmittel verwendet werden konnte. Dieses reagiert jedoch selbst gut mit OH-Radikalen unter Freisetzung von Methyl-Radikalen (entsprechend nachstehender Reaktion), die möglicherweise schlechter an das Nitron addieren.



Für die Eignung als Fluoreszenzsonde ist es ausreichend, wenn die Verbindung Radikale abfängt. Ein stabiles Spin-Addukt ist dagegen keine Voraussetzung, da das aus dem Spin-Addukt entstehende Hydroxylamin fluoreszenzspektrometrisch erfasst werden soll.

4.3.2.2 UV/Vis-spektroskopische Untersuchung

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Verbindung **10** musste die Untersuchung einer möglichen Veränderung der Konjugation im Molekül durch Addition von Radikalen in DMSO durchgeführt werden. Zur Erzeugung von Hydroxylradikalen über die Fenton-Reaktion wurde bei den Messungen das Verhältnis von Nitron **10** (10 μM) : H_2O_2 : Fe(II) = 1:1:1 bis auf 1:10:10 erhöht. Dafür wurde eine 1 mM Stammlösung des Nitrons **10** in DMSO und jeweils 10 mM wässrige Stammlösungen von Fe(II) -chlorid und Wasserstoffperoxid verwendet. Die jeweiligen Zugaben von Wasserstoffperoxid/ FeCl_2 wurden im Abstand von zehn Minuten vorgenommen. Aufgrund der nahezu diffusionskontrollierten Reaktion der OH-Radikale mit DMSO (s.o.) kann bei den Messungen davon ausgegangen werden, dass das Nitron **10** Methyl-Radikale abfängt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte jeweils nach einer Minute. Eine erneute Messung nach fünf Minuten stellte sicher, dass keine weitere Intensitätsänderung auftrat. Durch die Erhöhung der Radikalkonzentration zeigte sich lediglich eine geringe Intensitätszunahme des Absorptionsmaximums ($\lambda_{\text{max}} = 312 \text{ nm}$) sowie eine geringe Intensitätsabnahme des lokalen Maximums (363 nm).

Tabelle 4-2: Veränderung der Absorptionsmaxima des Nitrons **10** nach Methyl-Radikalabfang.

Wellenlänge [nm]	log ϵ	log ϵ
	Nitron 10	Nitron 10 : H_2O_2 : Fe(II) = 1:10:10
312 (λ_{max})	4.785	4.814
363	4.605	4.533

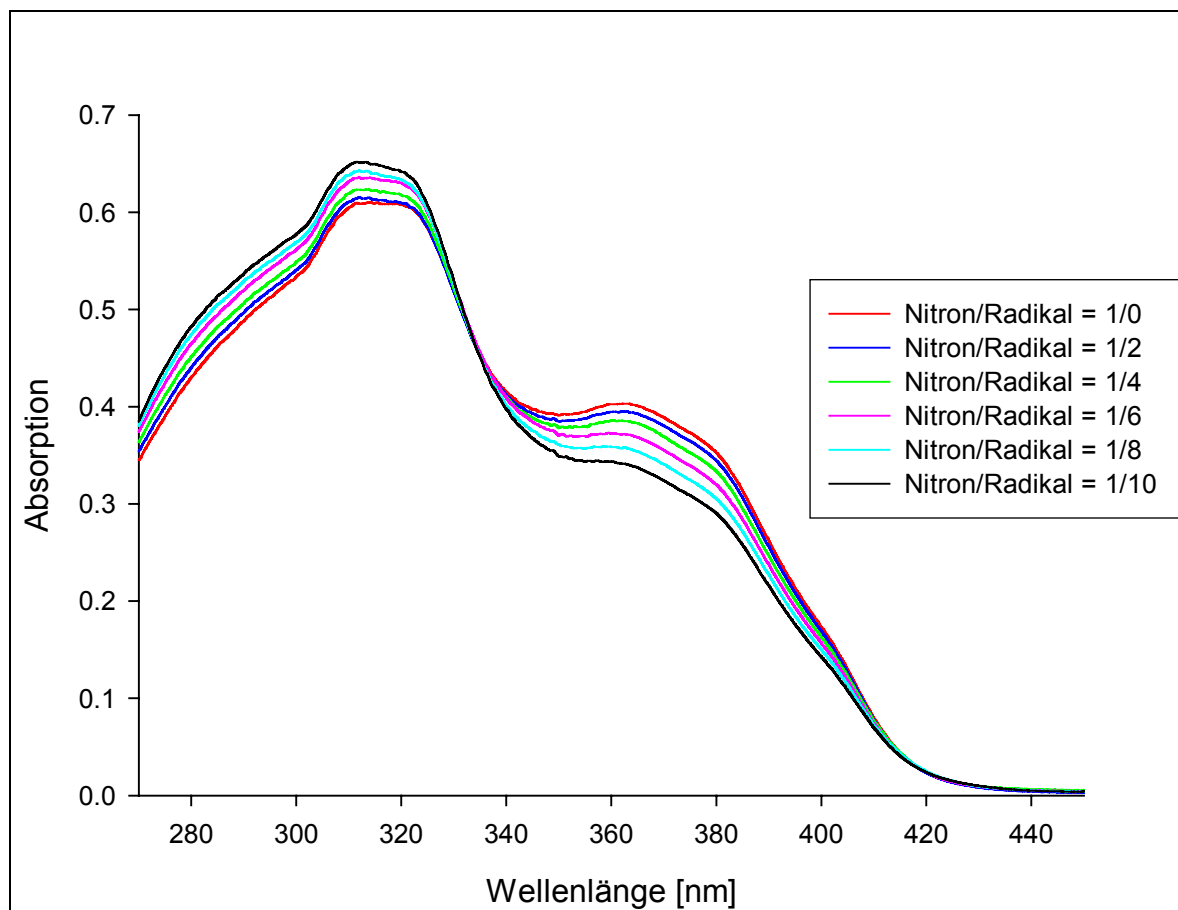
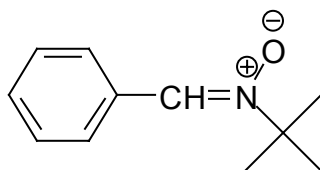


Abbildung 4-5: UV/Vis-Spektren der Reaktion von Nitron **10** (10 μM) mit Methyl-Radikalen (Fenton-Reaktion/DMSO). Aufnahme der Spektren jeweils 5 Minuten nach Zugabe der Radikalquelle $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}(\text{II})$.

Die im UV/Vis-Spektrum zu beobachtende π - π^* -Absorptionsbande liegt im für C,N-Diarylnitrone typischen Bereich von 315 – 419 nm. Die Abnahme dieser Bande bei 363 nm ist durch die Entstehung einer C–N-Einfachbindung – verursacht durch den Radikalabfang – zu erklären. Allerdings ist die Intensitätsabnahme sehr gering. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass dies eventuell auch auf das Lösungsmittel DMSO zurückzuführen ist, welches selbst ein gutes Target für OH-Radikale ist (s.o.). Aus diesem Grunde sollten weitere Untersuchungen zum Verhalten unterschiedlich substituierter Nitrone in wässrigem Medium stattfinden. Hierzu wurden die mit Phenyl- und *tert.*-Butyl-Resten substituierten Nitrone **13** und **15** sowie ihre Hydroxylamine **14** und **16** untersucht (siehe Abschnitt 4.3.3/4.3.4).

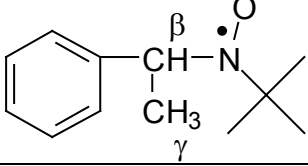
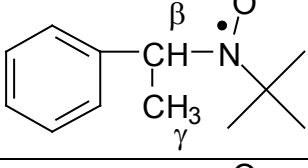
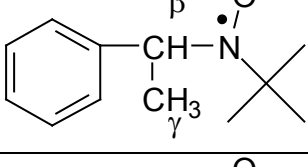
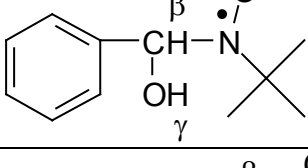
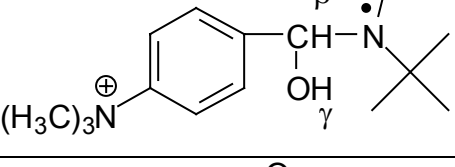
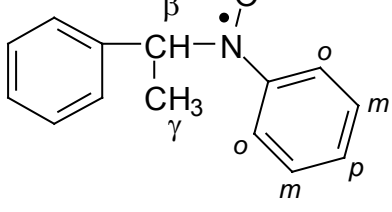
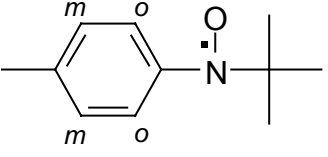
4.3.3 N-TERT.-BUTYL- α -PHENYLNITRON (**13**)



4.3.3.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Der bekannte Radikalfänger N-*tert.*-Butyl- α -phenylnitron (**13**) (PBN) wird seit mehr als 30 Jahren zum Abfang verschiedener O- und C-zentrierter Radikale ($\cdot\text{OH}$ etc.) verwendet. Die resultierenden langlebigen Nitroxide sind für ESR-Studien zugänglich und erlauben Rückschlüsse auf die Natur des eingefangenen Radikals. Aufgrund dessen wurde bei der Untersuchung des synthetisierten und eindeutig mittels NMR-Spektroskopie identifizierten Nitrons **13** auf eine Überprüfung der Fänger-Qualitäten durch ESR-Untersuchungen verzichtet. In Tabelle 4-3 wurden nachfolgend Literaturdaten von $\cdot\text{OH}$ - und $\cdot\text{CH}_3$ -Addukten des PBN (**13**) und des α ,N-Diphenylnitrons (**15**) sowie ähnlicher Verbindungen zu Vergleichszwecken der in den folgenden Abschnitten als Fänger verwendeten Nitrone zusammengefasst.

Tabelle 4-3: ESR-spektroskopische Daten der $\cdot\text{OH}$ - und $\cdot\text{CH}_3$ -Spin-Addukte einiger literaturbekannter Phenylnitrone.

Radikal	a_N [G]	a_H^β [G]	a_H^γ [G]	a_H^o [G]	a_H^m [G]	a_H^p [G]	g - Faktor	Lösungs- mittel
	14.85	3.53 (1H)	-	-	-	-	2.0062	Benzol ^[77]
	16.49	3.61 (1H)	-	-	-	-	2.0059	Wasser ^[77]
	14.5	3.8 (1H)	0.47 (3H)	-	-	-	-	Toluol ^[78]
	15.43	2.62 (1H)	-	-	-	-	-	Wasser/ SDS ^[79]
	15.22	2.18 (1H)	0.23 (1H)	-	-	-	-	Wasser/ SDS ^[79]
	10.63	5.39 (1H)	0.31 (3H)	2.66 (2H)	0.92 (2H)	2.73 (1H)	-	Toluol ^[80]
	13.0	-	-	2.00 (2H)	0.92 (2H)	-	-	Dichlor- methan ^[81]

4.3.3.2 UV/Vis-spektroskopische Untersuchung

Die Untersuchungen zur Veränderung der UV/Vis-spektroskopischen Eigenschaften des N-*tert*-Butyl- α -phenylnitrons (**13**) durch Radikal-Abfang wurden in wässrigem Milieu mit einem Anteil von 1 % DMSO durchgeführt. Die Erzeugung von Hydroxylradikalen erfolgte über die Fenton-Reaktion. In Abbildung 4-5 sind die erhaltenen Spektren des Nitrons **13** sowie des bei Abfang von Methyl-Radikalen entstehenden, synthetisierten Hydroxylamins **14** dargestellt. Die Konzentration beträgt jeweils 10 μM . Zudem sind die bei einem Verhältnis Nitron/Radikal von 1:4 bzw. 1:8 erhaltenen Spektren abgebildet, welche fünf Minuten nach Zugabe der Radikalquelle aufgenommen wurden.

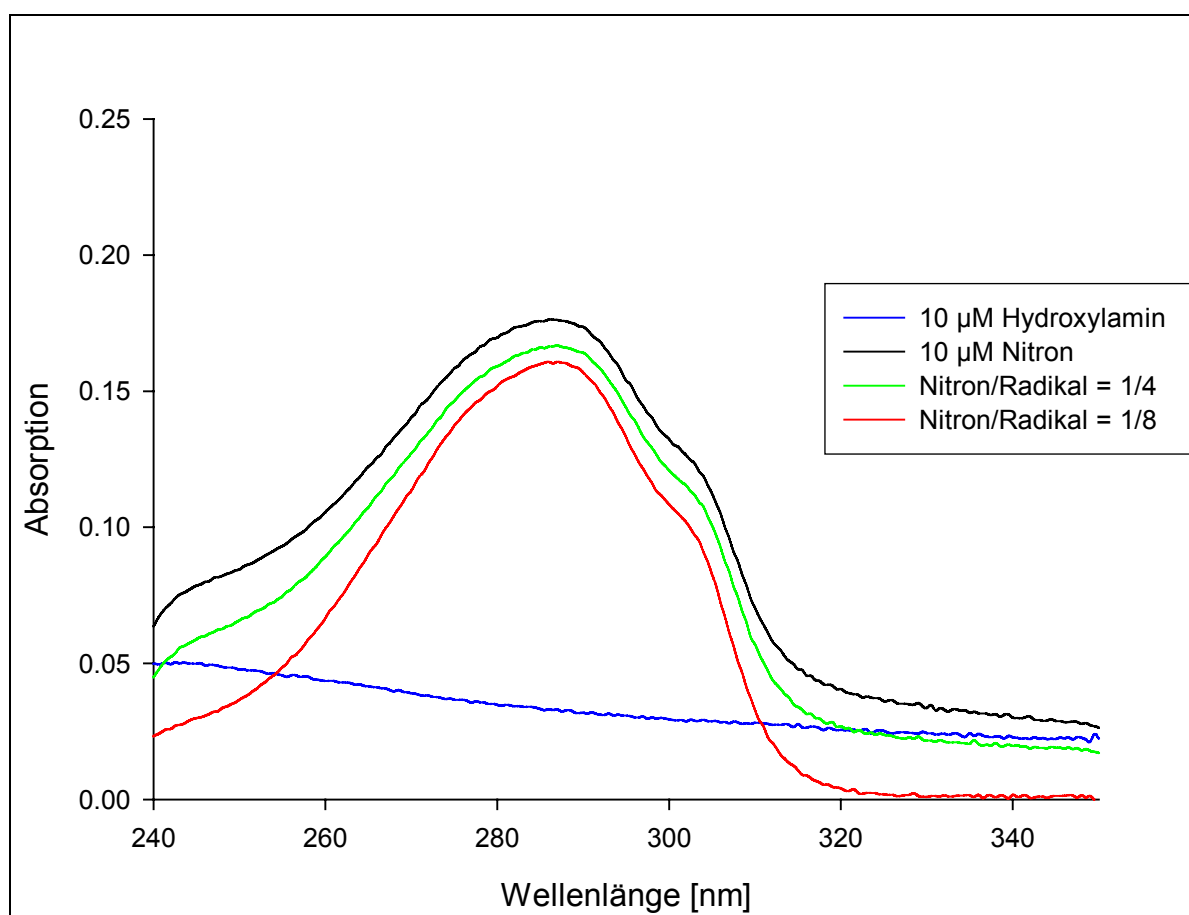
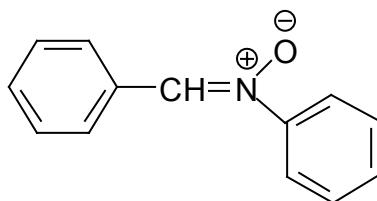


Abbildung 4-6: UV/Vis-Spektren des Nitrons **13** (10 μM), des Hydroxylamins **14** (10 μM) und der Reaktion von Nitron **13** (10 μM) mit Methyl- Radikalen (Fenton-Reaktion/DMSO).

Hierbei zeigte sich, dass sich die Spektren vor und nach Radikalabfang deutlich unterscheiden müssten, da das Nitron **13** ein Absorptionsmaximum von 0.18 bei

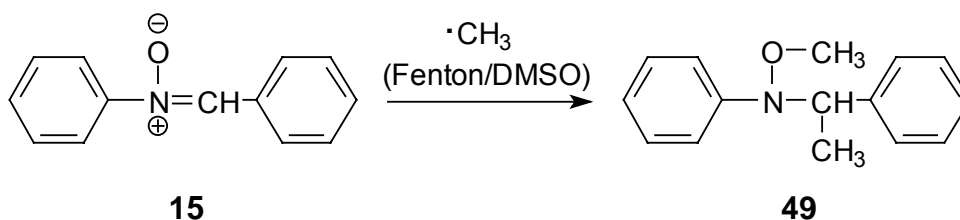
286 nm besitzt. Diese Bande ($\log \varepsilon = 4.246$) resultiert aus dem π - π^* -Übergang ($C=N$) im Nitron **13**. Das Hydroxylamin **14** absorbiert dagegen in diesem Bereich aufgrund der nicht vorhandenen Doppelbindung im Vergleich zum Nitron sehr viel schwächer ($A(\lambda_{286}) = 0.03$), so dass nach Radikalabfang, d.h. wenn die Nitron-Gruppe vollständig oder zumindest weitestgehend umgesetzt ist, diese Bande abnehmen sollte. Dies war jedoch nur in geringem Ausmaß der Fall. Bei einem hohen Überschuss an Radikalen (Nitron/Radikal = 1:8) erfolgte eine Abnahme dieser Bande auf $\log \varepsilon = 4.205$.

4.3.4 N, α -DIPHENYLNITRON (**15**)



4.3.4.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Die Eignung als Radikalfänger wurde durch Reaktion des Nitrons **15** mit Radikalen im NMR-Maßstab untersucht. Hierbei wurden Bedingungen gewählt, die auch anschließend bei den UV/Vis-Messungen angewendet werden sollten (Nitron **15** : H_2O_2 : $FeCl_2$ = 1:10:10, 1 % DMSO). Es zeigte sich, dass als Hauptprodukt dieser Radikalreaktion das entsprechende Methylhydroxylamin **49** des Nitrons **15** entsteht. Das Nitron **15** ist nach dieser Reaktion im NMR nicht mehr nachzuweisen und hat somit vollständig reagiert (ausführliche Beschreibung im Abschnitt 7.6.7).



4.3.4.2 UV/Vis-spektroskopische Untersuchung

Die Untersuchung des Nitrons **15** erfolgte analog der im Abschnitt 4.3.3.2 geschilderten Untersuchung des PBN **13**. Auch hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied des Nitrons **15** zum Abfangprodukt, dem Hydroxylamin **49**. Die

Intensitätsabnahme des Absorptionsmaximums, die bei Radikalabfang auftritt, ist ebenfalls nur gering ($\lambda_{\text{abs}} = 306 \text{ nm}$, $\Delta_{\text{Intensität}} = 0.0182$).

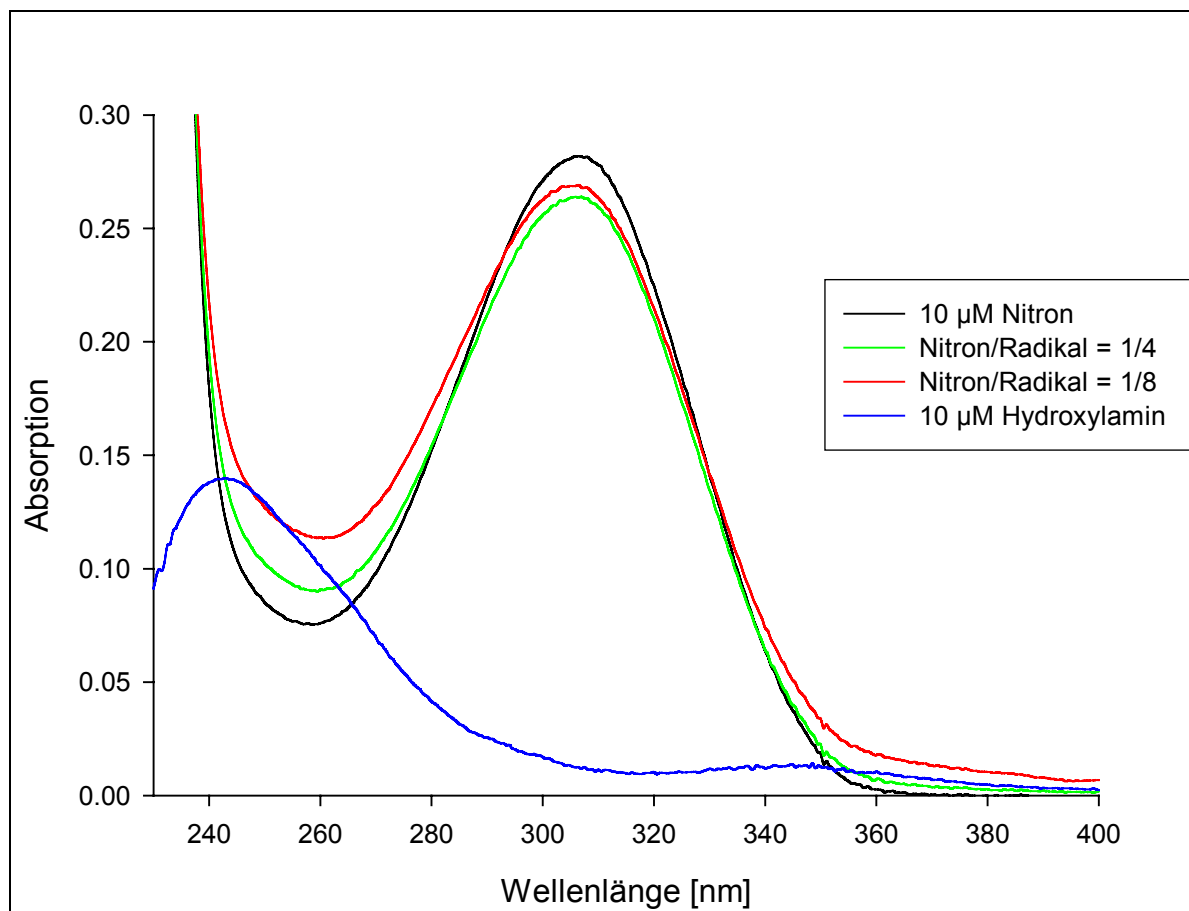


Abbildung 4-7: UV/Vis-Spektren des Nitrons **15** (10 µM), des Hydroxylamins **49** (10 µM) und der Reaktion von Nitron **15** (10 µM) mit Methyl- Radikalen (Fenton-Reaktion/1 % DMSO).

Um festzustellen, welche Abnahme der Nitron-Konzentration der gemessenen Intensitätsabnahme des π - π^* -Übergangs bei 306 nm entspricht, wurde eine konzentrationsabhängige UV/Vis-Messung durchgeführt. Dabei wurde das Verhältnis von Nitron **15** zu Hydroxylamin **49** von 10:0 bis hin zu 0:10 variiert.

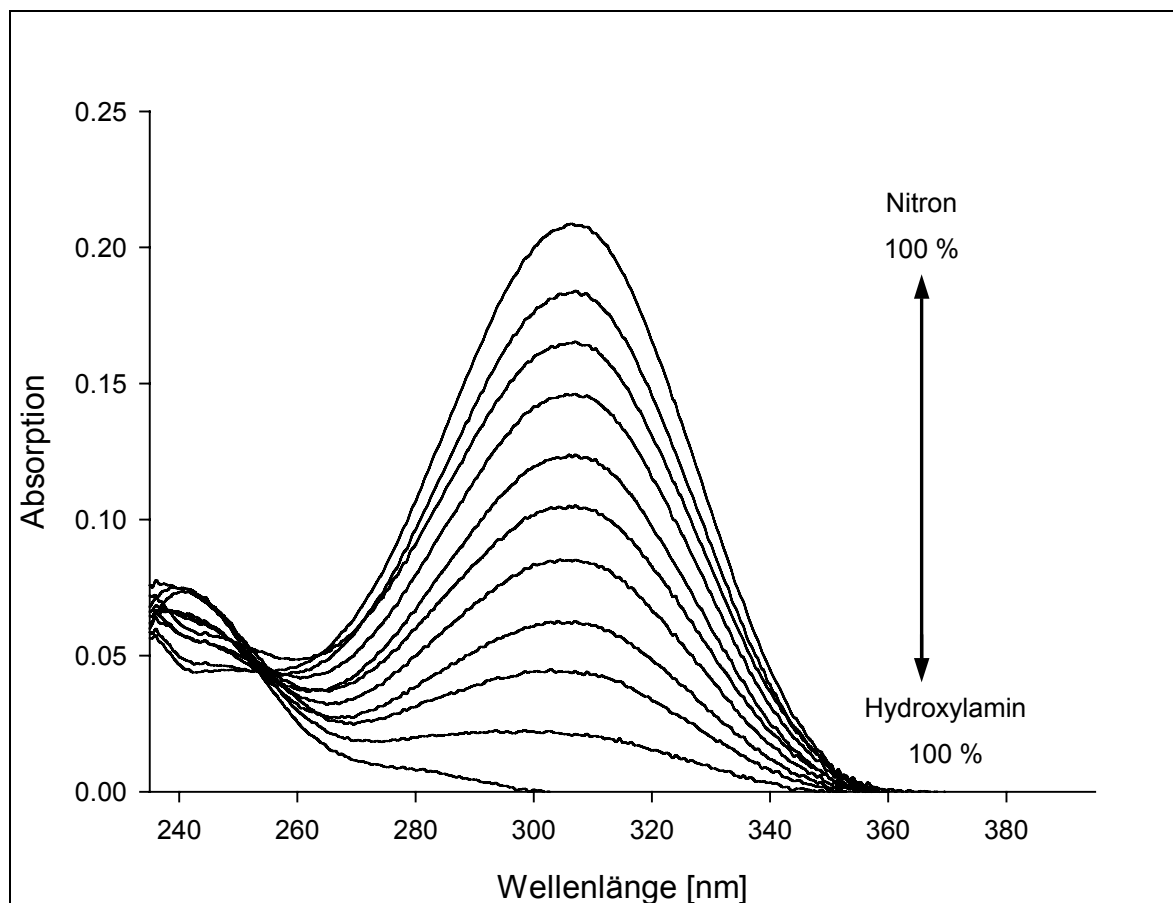
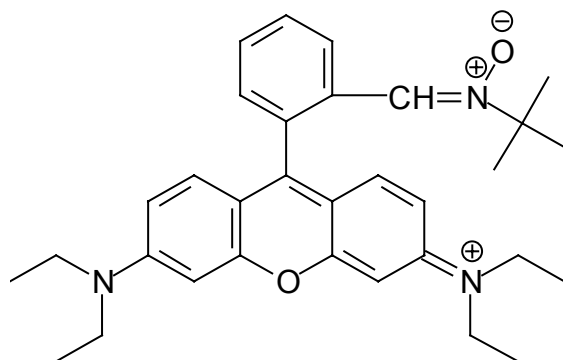


Abbildung 4-8: UV/Vis-Spektren des Hydroxylamins **49** und des Nitrons **15** im Verhältnis von 0:10 bis 10:0 in H₂O (1 % DMSO).

Es zeigte sich, dass eine Intensitätsabnahme von 0.0182 einem Verhältnis von Nitron zu Hydroxylamin von 9:1 entspricht. Um eine signifikante Veränderung des Signals zu erreichen, müsste allerdings mindestens die Hälfte des Nitrons zum Hydroxylamin abreagieren. Dieses Ergebnis kann man hinsichtlich der angestrebten fluoreszierenden Radikalfänger so deuten, dass kleine Konzentrationen an Radikalen nur dann detektierbar sind, wenn der Radikalfänger zunächst nicht fluoresziert und erst mit dem Abfang eine Fluoreszenz auftritt. Eine geringfügige Fluoreszenzänderung bei gleichbleibender Absorptions- und Emissionswellenlänge dürfte dagegen keine ausreichende Empfindlichkeit ergeben. Alternativ zu dieser Art von „Lichtschalter“ wäre eine Detektion kleiner Radikal-Konzentrationen denkbar, wenn Nitron und Abfangprodukt Fluoreszenzmaxima aufweisen, die genügend weit auseinander liegen (> 50 nm).

4.3.5 TERT.-BUTYLNITRONO-RHODAMIN B (**23**)


4.3.5.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Die Eignung der Verbindung **23** als Radikalfänger wurde durch Reaktion mit OH \cdot , CH $_2$ OH \cdot und Superoxid-Radikalen mittels ESR-Spektroskopie untersucht. Die Messungen erfolgten in Wasser/Methanol-Gemischen. Es wurden 1 mM Stammlösungen von Wasserstoffperoxid und FeCl $_2$ in Wasser sowie des Nitrons **23** in Methanol verwendet. Das Verhältnis des Nitrons **23** zu den jeweiligen Radikalen betrug 10/1 mit Ausnahme von **23**/Superoxid \approx 1/200 (siehe Abschnitt 7.7.1). Nachfolgend sind die erhaltenen ESR-Spektren abgebildet. Alle Spektren zeigen die ^{14}N -Triplettaufspaltung im Bereich von 15-17 G, die für Nitroxid-Radikale charakteristisch ist (Vgl. Tabelle 4-3).

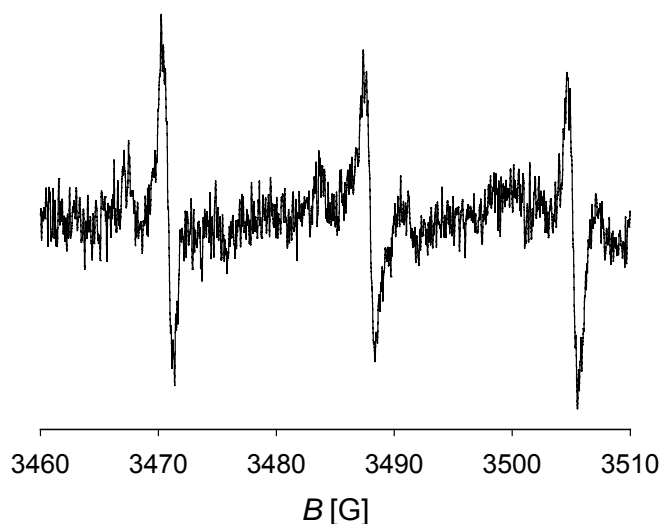


Abbildung 4-9: ESR-Spektrum des Spin-Adduktes der Reaktion des Nitrons **23** mit Superoxid-Radikalen (Wasser/Methanol = 5:1, Modulationsamplitude: 1.0 G, Mikrowellenfrequenz: 9.8 GHz, Mikrowellenleistung: 10 dB, Verstärkung: 1×10^5 , Scanzeit: 168 s, Zeitkonstante: 41 ms).

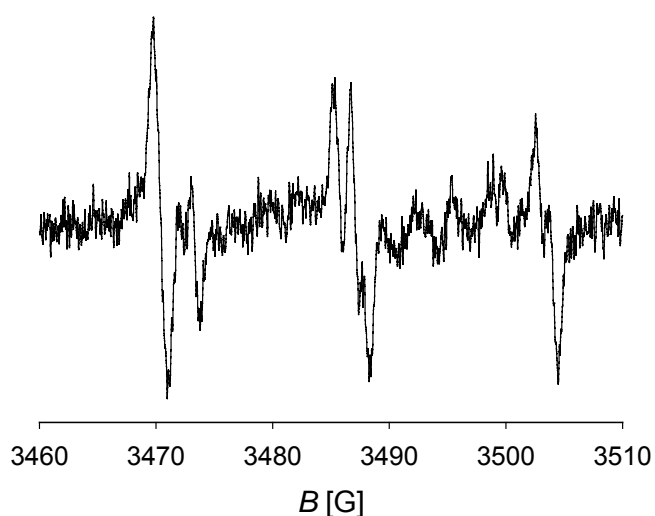


Abbildung 4-10: ESR- Spektrum des Spin-Adduktes der Reaktion des Nitrons **23** mit Hydroxyl-Radikalen (Fenton: Nitron **23** / H_2O_2 / Fe(II) = 10:1:1 in Wasser/Methanol = 5:1, Modulationsamplitude: 1.0 G, Mikrowellenfrequenz: 9.8 GHz, Mikrowellenleistung: 10 dB, Verstärkung: 1×10^5 , Scanzeit: 336 s, Zeitkonstante: 82 ms).

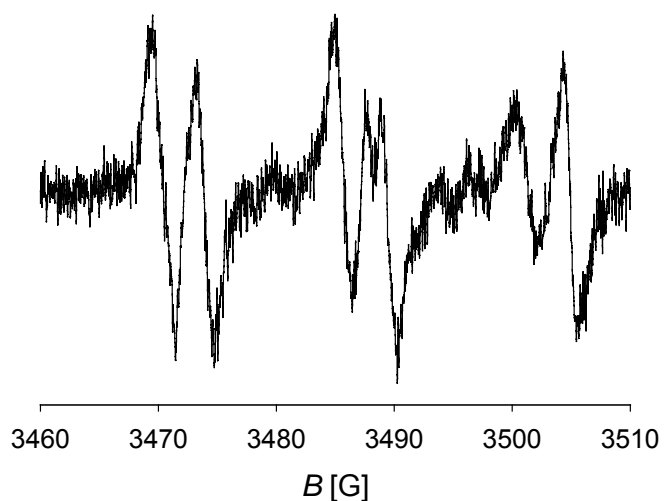


Abbildung 4-11: ESR- Spektrum des Spin-Adduktes der Reaktion des Nitrons **23** mit $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ -Radikalen (Fenton: Nitron **23** / H_2O_2 / Fe(II) = 10:1:1 in Wasser/Methanol = 1:1, Modulationsamplitude: 1.0 G, Mikrowellenfrequenz: 9.8 GHz, Mikrowellenleistung: 10 dB, Verstärkung: 1×10^5 , Scanzeit: 336 s, Zeitkonstante: 82 ms).

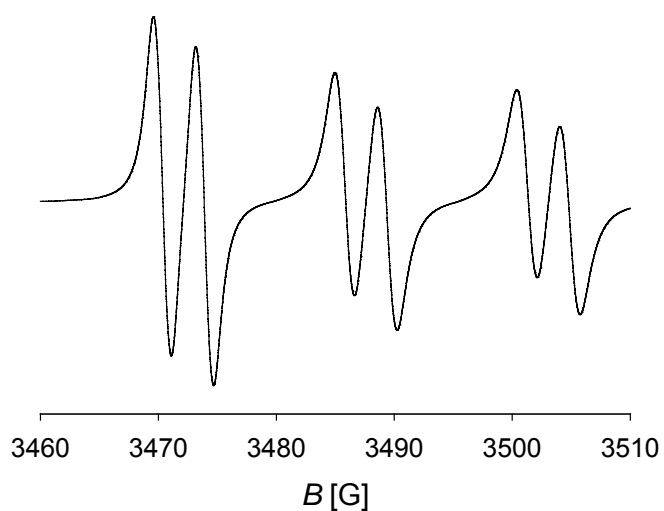
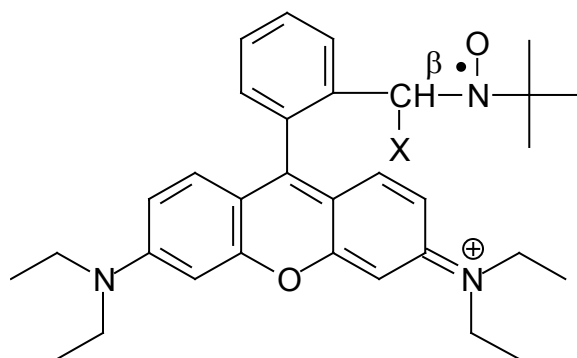


Abbildung 4-12: Simuliertes ESR-Spektrum für den Abfang von $\bullet\text{CH}_2\text{OH}$ -Radikalen durch das Nitron **23**.

Aus den ESR-Spektren wurden mittels Simulation (Beschreibung in Abschnitt 7.7.1) die in Tabelle 4-4 dargestellten Kopplungskonstanten und g -Werte der Spin-Addukte ermittelt.



50

Tabelle 4-4: Ermittelte Kopplungskonstanten und g -Wert der Spin-Addukte aus der Reaktion des Nitrons **23** mit Radikalen.

Radikal	a_N [G]	a_H^β [G]	g -Wert
$\text{O}_2\bullet\text{---}\bullet\text{OOH}$	17.14	-	2.00558(4)
$\bullet\text{OH}$	14.99	3.37 (1H)	2.00558(2)
$\bullet\text{CH}_2\text{OH}$	15.47	3.59 (1H)	2.00614(1)

Die Zuordnung des in Abbildung 4-9 gezeigten Spektrums zum Superoxid-Addukt ist aufgrund einer nicht aufgelösten β -H-Kopplung nicht sicher, doch sprechen die relativ große ^{14}N -Kopplung und der vergleichsweise niedrige g -Faktor für ein O-zentriertes Radikal. Bei dem in Abbildung 4-10 dargestellten Spektrum spricht der g -Wert für ein O-zentriertes Addukt, doch erscheint die β -H-Kopplung für ein OH-Addukt etwas zu groß zu sein (Vgl. Tabelle 4-3). Die Kopplung des γ -H müsste dann innerhalb der Linienbreite liegen (Vgl. Tab. 4-3: $a_{\text{H}}^{\gamma} = 0.23 \text{ G}$ in Wasser/SDS)^[79], so dass auch diese Zuordnung nicht sicher ist. Die erhöhten Werte für die ^{14}N -Kopplung, der g -Faktor und die Größe der β -H-Kopplung des Spin-Addukts der Reaktion von Nitron **23** in Gegenwart eines hohen Anteils Methanol (Abbildung 4-11) sprechen dafür, dass tatsächlich $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ -Radikale abgefangen wurden (Vgl. Tab. 4-3). Die Kopplung der beiden γ -H-Atome liegt auch hier wahrscheinlich innerhalb der Linienbreite (Vgl. Tabelle 4-3). Die ESR-Messungen ergaben, dass die Verbindung **23** zwar Hydroxyl-Radikale und wahrscheinlich auch Superoxid-Radikale fängt, die Effektivität des Abfangs aber gering ist und zudem die Spin-Addukte recht instabil sind. Das Abfangprodukt der Reaktion mit $\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ -Radikalen ist dagegen relativ stabil. Somit ist die Eigenschaft des Radikal-Abfanges zumindest für C-zentrierte Radikale erfüllt.

4.3.5.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die Fluoreszenzmessung von Verbindung **23** ergab ein Absorptionsmaximum von 570 nm und ein Fluoreszenzmaximum von 590 nm in Tris/HCl-Puffer (pH 8.2) / Methanol = 5:1. Die OH-Radikale wurden hier – wie auch bei den ESR-Messungen – über die Fenton-Reaktion erzeugt. Dabei wurde bei einem Verhältnis von Nitron (5 μM) / Wasserstoffperoxid / Fe(II)chlorid von 1:5:5 und 1:10:10 gemessen. Durch den Zusatz von Methanol wurden hier vermutlich OH- und/oder CH_2OH -Radikale abgefangen. Es konnte weder eine Wellenlängenverschiebung noch eine signifikante Intensitätsänderung festgestellt werden. In Abbildung 4-13 ist das Fluoreszenzspektrum des Nitrons **23** sowie die Spektren nach Radikalzugabe dargestellt.

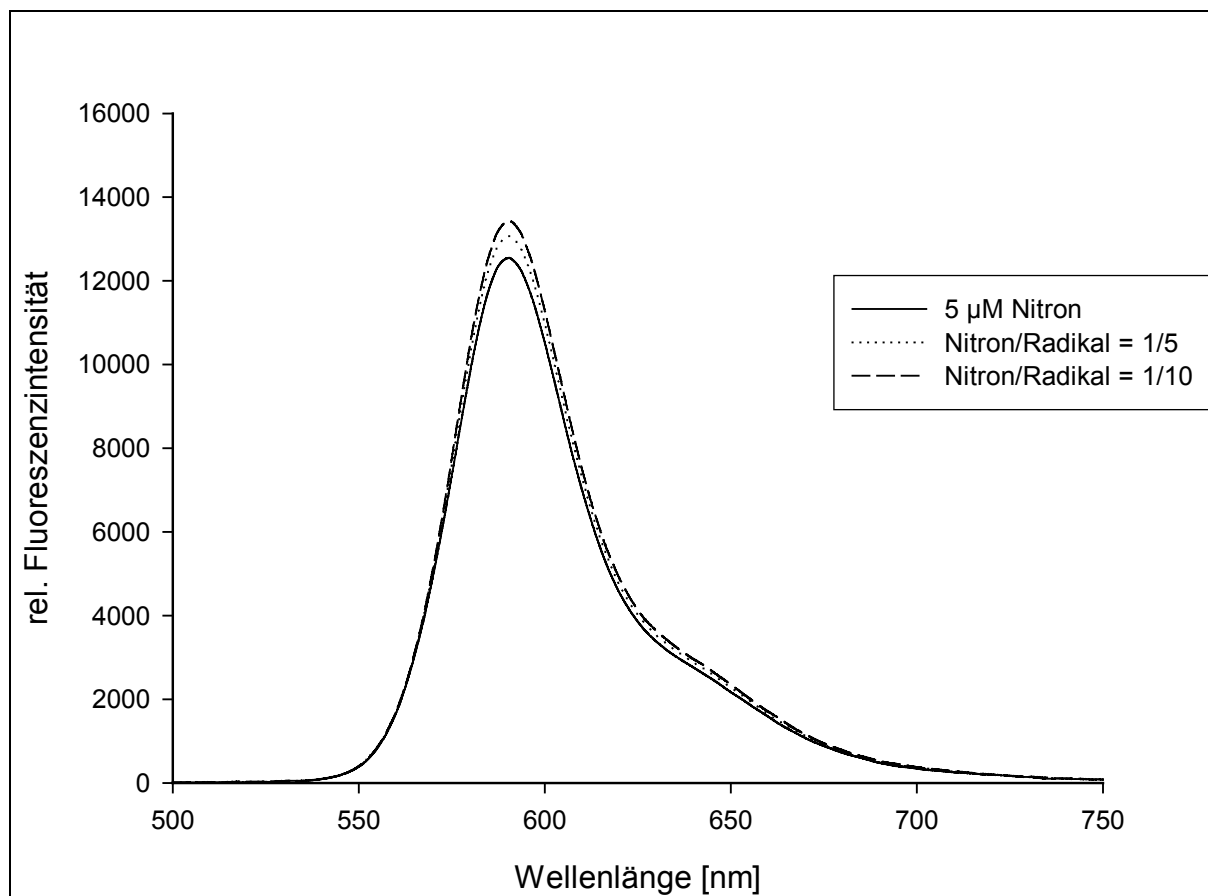


Abbildung 4-13: Fluoreszenzspektren der Reaktion von Nitron **23** (5 µM) mit Radikalen (Fenton-Reaktion/17 % Methanol).

Die Erzeugung von Superoxid-Radikalen erfolgte durch Zugabe von Kaliumsuperoxid zur Messlösung im Verhältnis Nitron/Superoxid = 1:5 bis 1:200. Aber auch hier konnte keine signifikante Intensitätsänderung oder Wellenlängenverschiebung beobachtet werden (Abbildung 4-14).

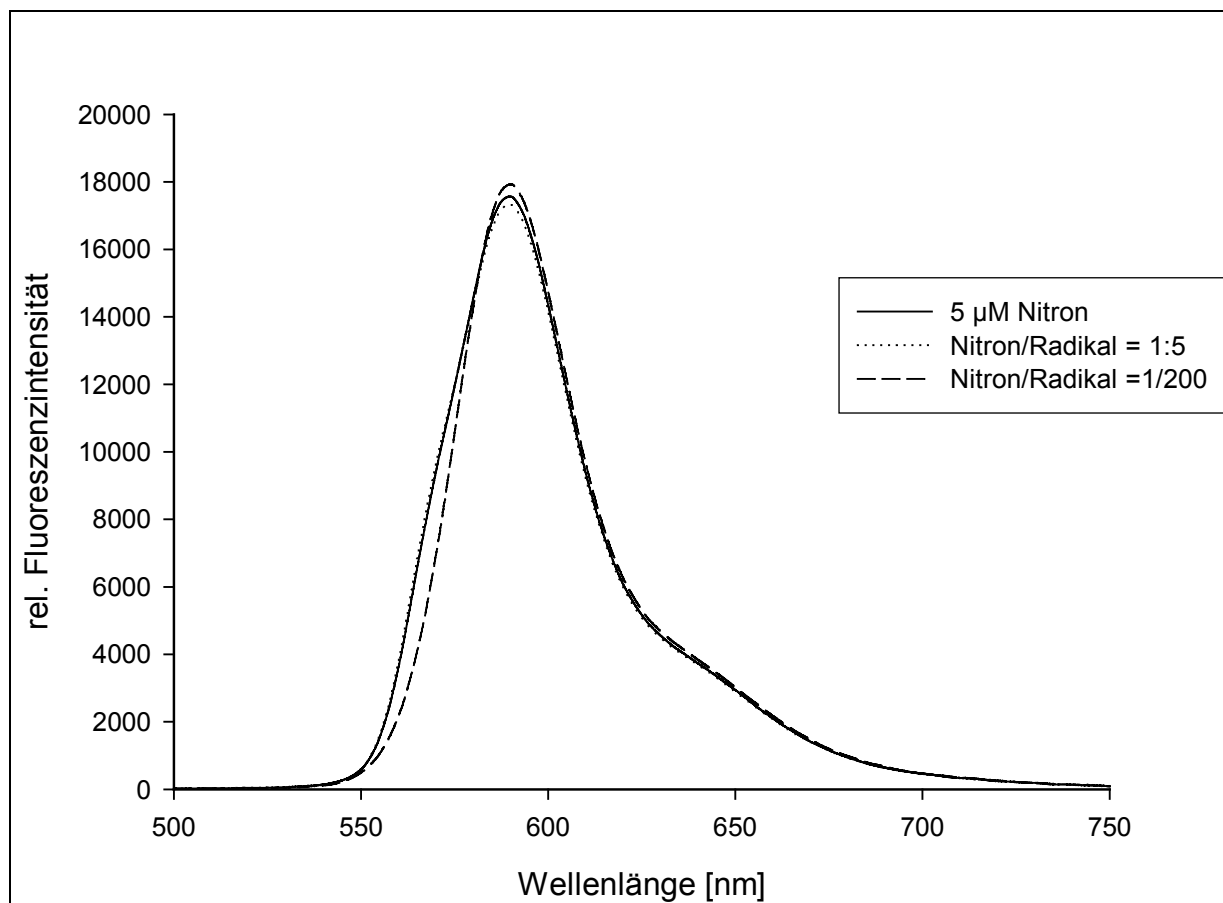
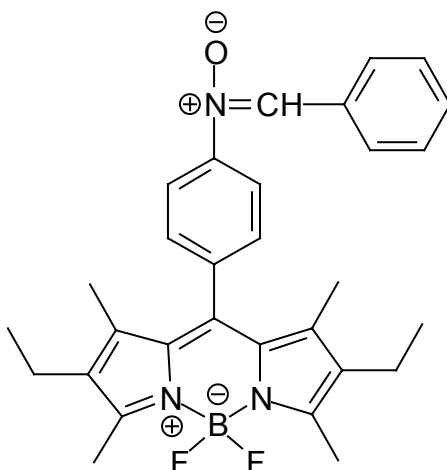


Abbildung 4-14: Fluoreszenzspektren der Reaktion von Nitron **23** (5 μM) mit Superoxid-Radikalen (Tris/HCl-Puffer, pH 8.2 / Methanol = 5:1).

Eine mögliche Ursache dafür, dass die Fluoreszenzspektren des Nitrons **23** vor und nach Radikalabfang nur eine geringfügige Zunahme der Intensität aufweisen, könnte an der Position der Nitron-Gruppe liegen. Die Fänger-Einheit hat in *ortho*-Position des Phenylrings wahrscheinlich einen zu geringen Einfluss auf das fluorophore System. Außerdem könnte der Einfluss der Nitron-Gruppe größer sein, wenn die Anbindung über das Stickstoffatom erfolgt, da hier im Abfangprodukt (Hydroxylamin) ein freies Elektronenpaar einen positiven mesomeren Effekt auf das Fluorophor ausüben könnte. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass bei einem Nitron, welches eine hohe Ausgangsfluoreszenz besitzt, nach Radikalabfang keine messbare Intensitätsänderung zu beobachten ist, da das entstehende Hydroxylamin wahrscheinlich eine ähnlich hohe Fluoreszenzintensität aufweist. Eine ausreichende Verschiebung ($> 50 \text{ nm}$) der Absorptions- und/oder Emissionswellenlänge ist bei einer nicht fluoreszierenden Fänger-Gruppe ebenfalls nicht zu erwarten. Daher ist es notwendig, Radikalfänger mit einer sehr geringen Fluoreszenzquantenausbeute

einzusetzen. Nach Radikalabfang sollte das entstehende Produkt fluoreszieren. Dieser Ansatz wurde in den Abschnitten 4.3.6 bis 4.3.8 und 4.3.10 verfolgt.

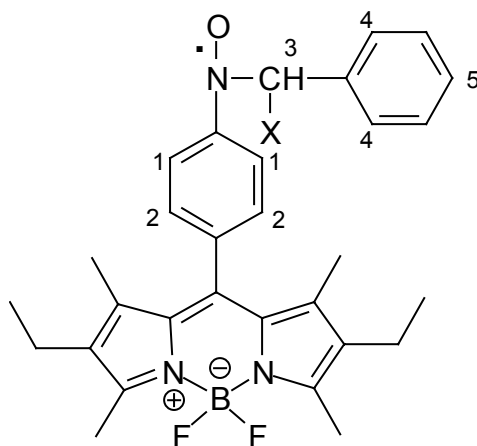
4.3.6 4,4-DIFLUORO-8-[4-(PHENYLNITRONO)PHENYL]1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**38**)



4.3.6.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Die Eignung der Verbindung **38** als Radikalfänger wurde durch Reaktion mit Radikalen, erzeugt über die Fenton-Reaktion, mittels ESR-Spektroskopie untersucht. Die Messungen erfolgten in Benzol/DMSO (1/2 v/v). Es wurden Stammlösungen von 10 mM der Verbindung **38** in Benzol und jeweils 10 mM Wasserstoffperoxid und Eisen(II)chlorid in DMSO verwendet. Das Verhältnis betrug Nitron **38**/H₂O₂/Fe(II) = 5 mM/2.5 mM/1.7 mM.

Zunächst erfolgte eine ESR-Untersuchung der Verbindung **38** ohne Zugabe einer Radikalquelle in Benzol. Es zeigte sich, dass bereits Radikale vorhanden sind (Abbildung 4-15). Die ESR-Daten sprechen eindeutig für ein Nitroxid-Radikal **51** der abgebildeten Struktur.



51

Eine Identifizierung der Gruppe X war aufgrund fehlender weiterer Aufspaltungen allerdings nicht möglich. Das Auftreten von „Untergrund“-Radikalen ist typisch für viele Radikalfänger, beeinträchtigt aber die weiteren Untersuchungen nicht. Die ermittelten Kopplungskonstanten und der g -Wert ist der Tabelle 4-4 zu entnehmen.

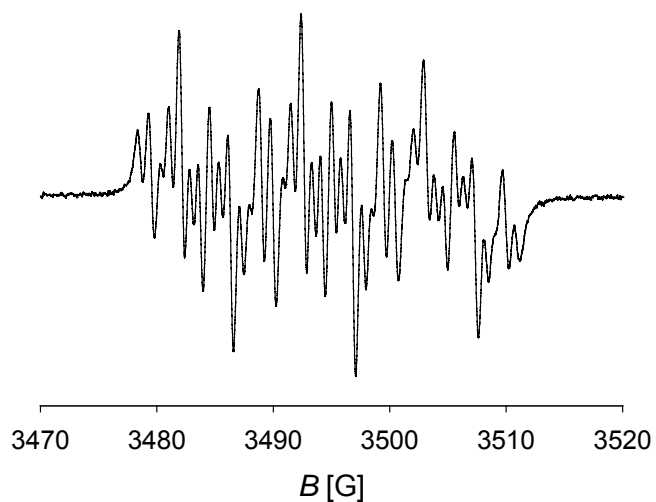


Abbildung 4-15: ESR-Spektrum des „Untergrund“-Radikals im Nitron **38** in Benzol (Experimentelle Bedingungen: Mikrowellenfrequenz: 9.8 GHz; Scanzeit: 336 s, Modulationsamplitude: 0.3 G, Mikrowellenleistung: 10 dB, Verstärkung: 1×10^5 , Zeitkonstante: 82 ms).

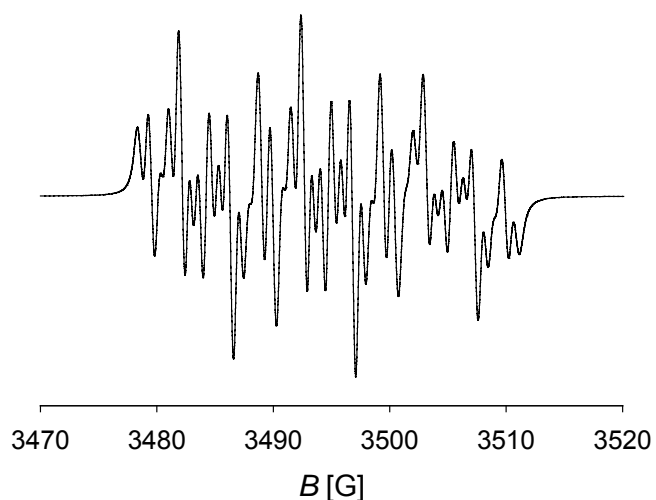


Abbildung 4-16: Simulation des ESR-Spektrums aus Abbildung 4-15.

Im Anschluss daran erfolgte die Untersuchung zum Abfang von OH- bzw. Methyl-Radikalen durch das Nitron **38**. In Abbildung 4-17 ist das entsprechende ESR-Signal des Spin-Adduktes aus der Reaktion Fe(II)/H₂O₂/DMSO dargestellt.

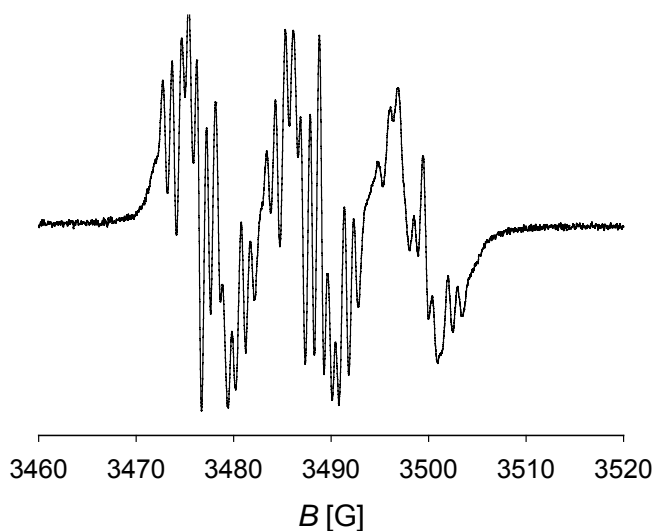


Abbildung 4-17: ESR-Spektrum des Abfangprodukts der Reaktion von **38** mit H₂O₂/FeCl₂ (5 mM / 2.5 mM / 1.7 mM) in Benzol/DMSO (1/2 v/v) (Experimentelle Bedingungen: Mikrowellenfrequenz: 9.8 GHz; Scanzeit: 671 s, Modulationsamplitude: 0.3 G, Mikrowellenleistung: 10 dB, Verstärkung: 1×10^5 , Zeitkonstante: 82 ms).

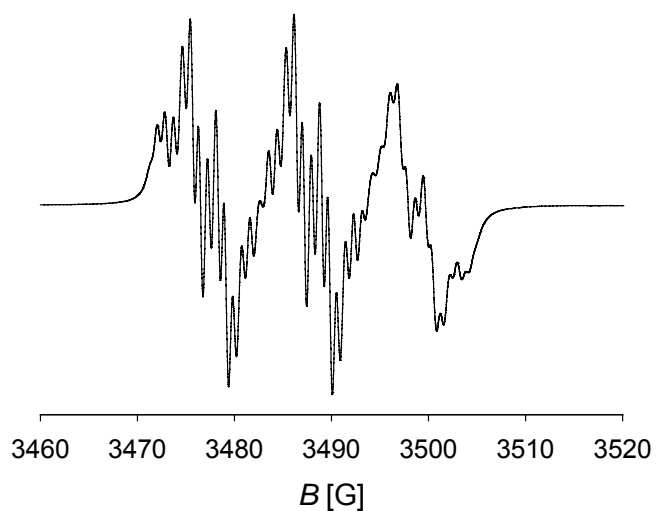


Abbildung 4-18: Simulation des ESR-Spektrums aus Abbildung 4-17.

In Tabelle 4-5 sind die ermittelten Kopplungskonstanten und der g -Faktor des Nitroxid-Radikals aus Abbildung 4-17 sowie die Werte für das bereits vorhandene „Untergrund“-Radikal aus Abbildung 4-15 aufgeführt.

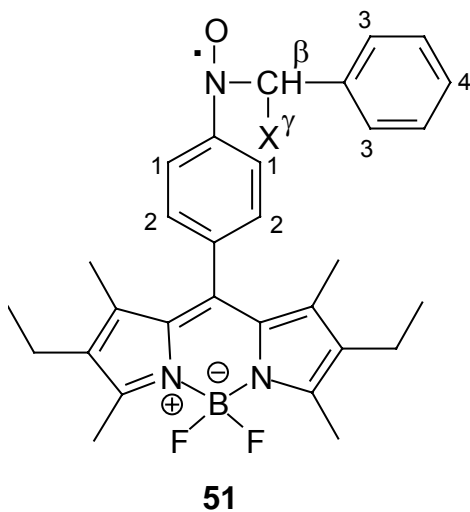


Tabelle 4-5: Ermittelte Kopplungskonstanten und g -Werte der Nitroxid-Radikale aus Abbildung 4-15 und 4-17.

Radikal	$a(N)$ [G]	$a(H^1)$ [G]	$a(H^2)$ [G]	$a(H^\beta)$ [G]	$a(H^3)$ [G]	$a(H^4)$ [G]	g -Wert
„Untergrund“- Radikal	10.49	2.61 (2H)	0.90 (2H)	4.16 (1H)	0.16 (2H)	0.28 (1H)	2.00572(2)
$\cdot OH/\cdot CH_3$	10.69	2.67 (2H)	0.91 (2H)	2.55 (1H)	-	-	2.00582(2)

Die Werte für die H^3 - und H^4 -Kopplungen wurden durch Simulation des Spektrums aus Abbildung 4-15 erhalten. Das gemessene ESR-Spektrum hat eine zu geringe Auflösung, um derart kleine Aufspaltungen sichtbar zu machen. Die Intensität des Signals im Vergleich zum bereits in der Verbindung vorhandenen Nitroxid-Radikals ist stark erhöht und die Struktur verändert, was darauf hindeutet, dass das Nitron **38** Radikale abfängt, die aus der Fenton-Reaktion bzw. aus Folgereaktionen entstehen. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich bei dem abgefangenen Radikal um das Methyl-Radikal handelt, da keine zusätzliche Quartettaufspaltung für eine CH_3 -Gruppe vorhanden ist. Eine Messung in Gegenwart von $[D_6]$ DMSO unterstützte dies, da dass gleiche ESR-Spektrum mit unveränderter Linienbreite beobachtet wurde (im Vgl. zu $X = CH_3$ sollte die Linienbreite bei $X = CD_3$ kleiner werden). Die relativ kleine β -H-Kopplung von 2.55 G spricht stark für das Abfangprodukt des OH-Radikals, wie ein Vergleich mit der Literatur (Tab. 4-3) zeigt. Dementsprechend sollte die β -H-Kopplung von 4.16 G des „Untergrund“-Radikals das Addukt eines C-zentrierten Radikals anzeigen. Die ESR-Untersuchung hat somit gezeigt, dass die Verbindung **38** prinzipiell als Radikal-Fänger geeignet ist.

4.3.6.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Das Absorptionsmaximum von Verbindung **38** in Methanol beträgt 520 nm, das Fluoreszenzmaximum 544 nm. Wie auch bei den ESR-Messungen erfolgte die Generierung der Radikale über die Fenton-Reaktion. Es wurde bei einem Verhältnis von Nitron **38** (10 μ M) / Wasserstoffperoxid / Fe(II)chlorid von 1:10:10 gemessen, wobei ein Zusatz von DMSO (1 %) erfolgte. Da als Lösungsmittel Methanol verwendet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass hier OH-, CH_3 - und/oder CH_2OH -Radikale abgefangen wurden. Bei der Fluoreszenzmessung konnte jedoch weder eine Wellenlängenverschiebung noch eine signifikante Intensitätsänderung festgestellt werden. In Abbildung 4-19 ist das Fluoreszenzspektrum des Nitrons **38** sowie die Spektren nach Radikalerzeugung dargestellt.

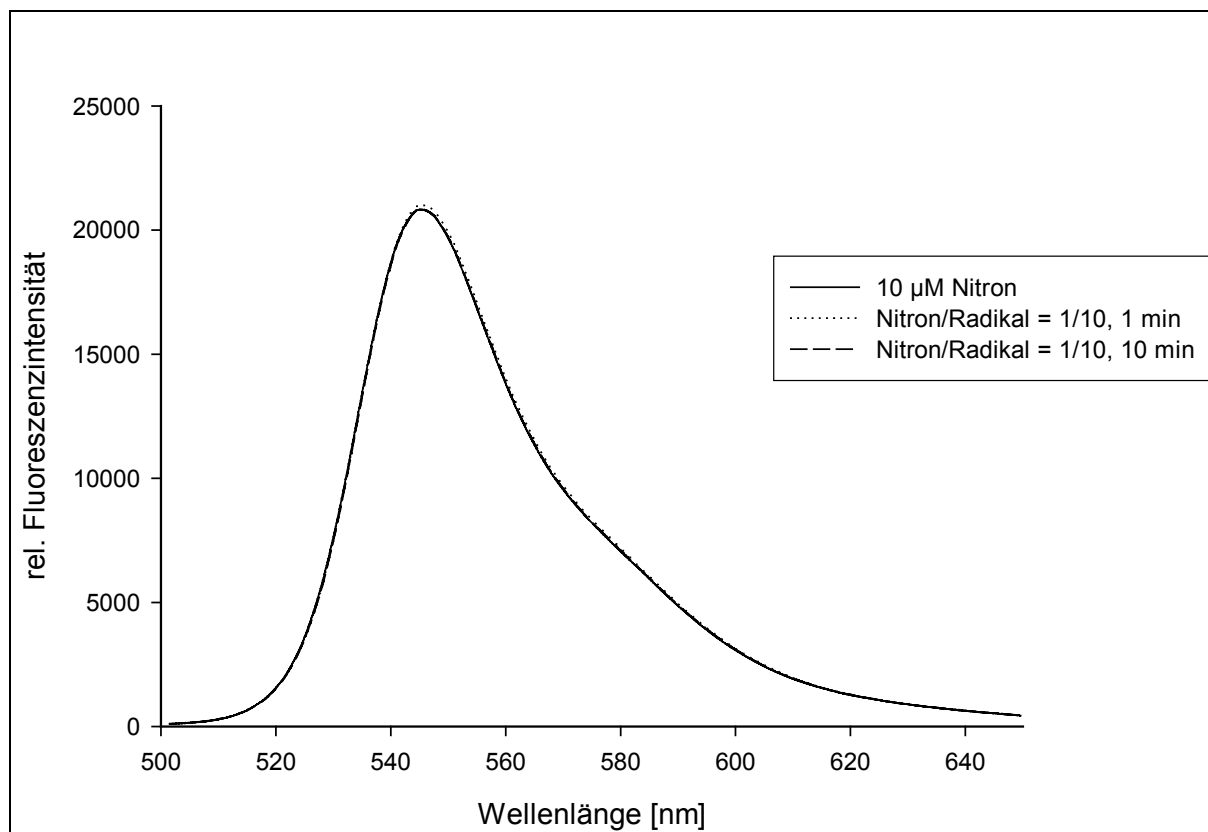
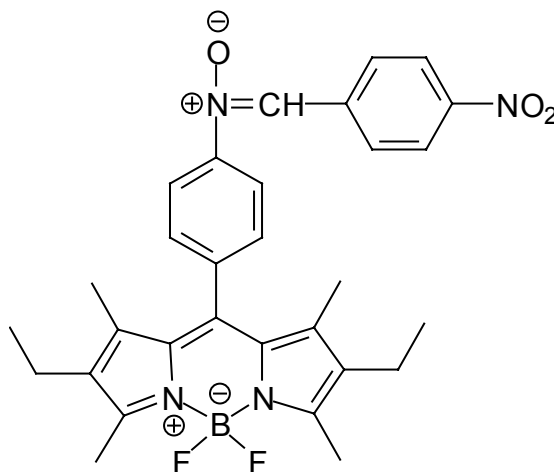


Abbildung 4-19: Fluoreszenzspektren des Nitrons **38** sowie von der Reaktion des Nitrons **38** mit Radikalen (1:10, Fenton) in Methanol/DMSO (1 %).

Eine Fluoreszenzerniedrigung oder -löschung des Nitrons **38** trat nicht ein, was darauf zurückgeführt werden kann, dass die Phenylnitron-Einheit auf das angeschlossene Fluorophor nicht oder nur in geringem Maße als Elektronen-Akzeptor wirkt. Eine Zunahme der Fluoreszenzintensität konnte vermutlich aufgrund der Tatsache, dass das entstehende Hydroxylamin eine ähnlich hohe Fluoreszenzintensität hat, nicht beobachtet werden.

4.3.7 4,4-DIFLUORO-8-[4-(4-NITROPHENYLNITRONO)PHENYL]1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**39**)



4.3.7.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Die Überprüfung der Eignung des Nitrons **39** als Radikalfänger erfolgte durch die Aufnahme von ESR-Spektren vor und nach Radikalabfang. Die Radikale wurden dabei über die Fenton-Reaktion in Benzol/DMSO (1/2 v/v) erzeugt. Es wurden 10 mM Stammlösungen der Verbindung **39** in Benzol und Wasserstoffperoxid und Eisen(II)chlorid in DMSO verwendet. Das Verhältnis der Reaktionspartner bei den Messungen betrug Nitron **39** / H₂O₂ / Fe(II) = 5 mM / 2.5 mM / 1.7 mM. Zunächst erfolgte eine ESR-Untersuchung des Nitrons **39** ohne Zugabe einer Radikalquelle in Benzol/DMSO (1/1 v/v). In diesem Fall konnte kein signifikanter Untergrund detektiert werden. Nach Zugabe der Radikalerzeuger konnte ein relativ intensives Signal eines Nitroxid-Radikals beobachtet werden (Abbildung 4-20).

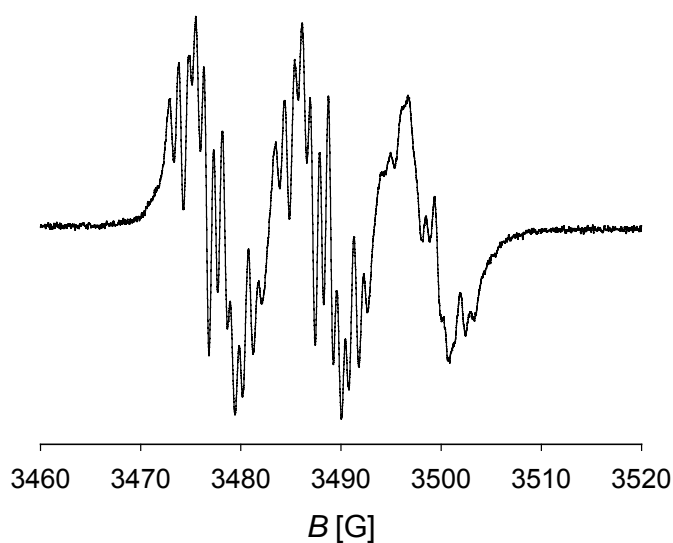


Abbildung 4-20: ESR-Spektrum des Abfangprodukts der Reaktion von **39** mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeCl}_2$ (5 mM / 2.5 mM / 1.7 mM) in Benzol/DMSO (Modulationsamplitude: 0.3 G, Mikrowellenleistung: 10 dB, Mikrowellenfrequenz: 9.79 GHz, Verstärkung: 1.0×10^5 , Scanzeit: 671 s, Zeitkonstante: 81.9 ms).

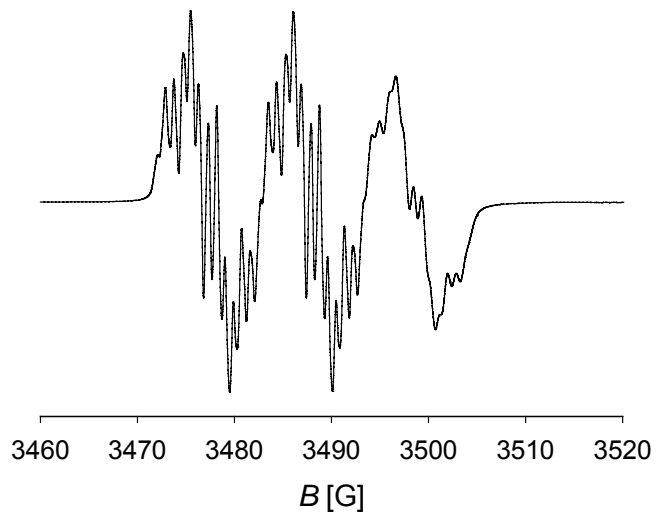
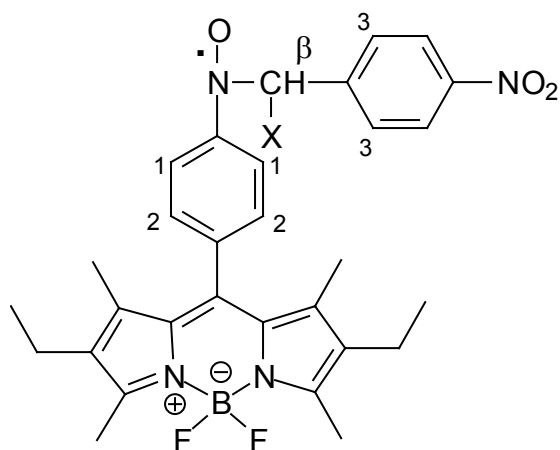


Abbildung 4-21: Simulation des ESR-Spektrums aus Abbildung 4-20.

Die Untersuchung hat gezeigt, dass es sich bei dem Radikal eindeutig um ein Nitroxid-Radikal folgender Struktur handelt:



52

Die ^{14}N -Kopplungskonstante beträgt 10.58 G, die H^1 -Kopplung 2.71 G (2H), die H^2 -Kopplung 0.85 G (2H) und die H^β -Kopplung 1.71 G (1H). Die wahrscheinlich innerhalb der Linienbreite liegende H^3 -Kopplung konnte nur in der Simulation des ESR-Spektrums mit 0.57 G (2H) bestimmt werden. Der g -Faktor des Nitroxid-Radikals beträgt 2.00586(2). Die ESR-Untersuchung hat somit den Nachweis erbracht, dass das Nitron **39** Radikale abfängt, welche aus der Fenton-Reaktion bzw. aus Folgereaktionen entstehen. Die Größe der β -H-Kopplung von 1.71 G und eine fehlende Quartett-Aufspaltung durch eine zusätzliche Methyl-Gruppe deuten wiederum auf das OH-Addukt hin. Eine Untersuchung in deuteriertem DMSO unterstützt dies, da keinerlei spektrale Änderung zu beobachten war. Für die Eignung als Radikalsonde im chemischen System ist die Art des abgefangenen Radikals zunächst nicht von Bedeutung. Für die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften vor und nach Radikalabfang muss lediglich sicher gestellt sein, dass das Nitron **39** die Radikale abfängt, die auf diesem Weg erzeugt werden.

4.3.7.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die Fluoreszenzmessung des mit einer elektronenziehenden Nitrogruppe versehenen Nitrons **39** wurde in Benzol/DMSO (1/1 v/v) ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 551 \text{ nm}$) durchgeführt. Die Radikalerzeugung erfolgte über die Fenton-Reaktion bei einem Verhältnis von Nitron / H_2O_2 /FeCl₂ von 1:10:10.

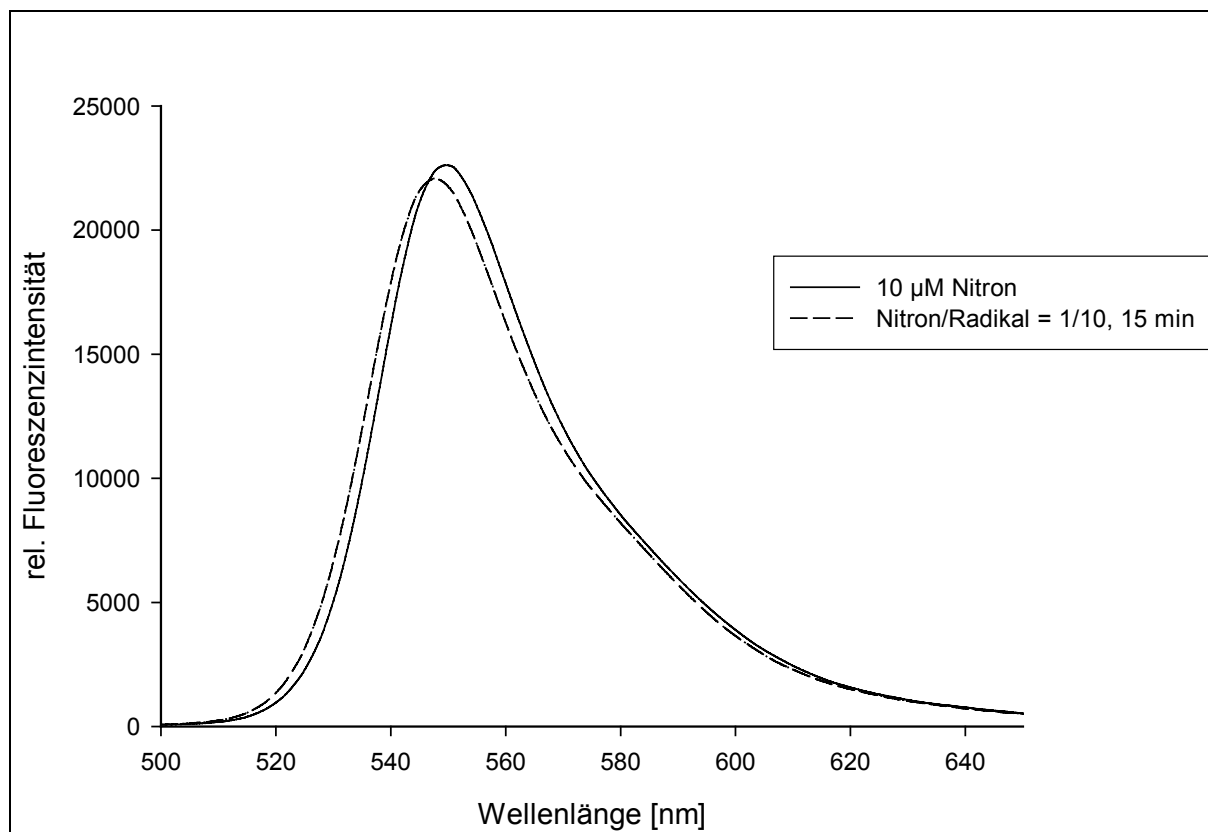
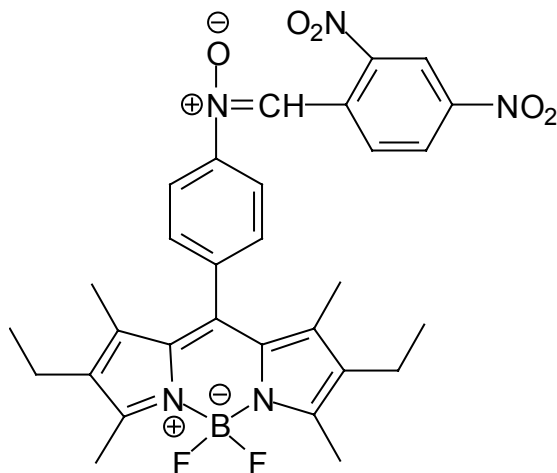


Abbildung 4-22: Fluoreszenzspektren des Nitrons **39** sowie von der Reaktion des Nitrons **39** mit Radikalen (1:10) in Benzol/DMSO (1/1 v/v).

Die Einführung einer Nitrogruppe in *para*-Position erbrachte nicht die erhoffte Verringerung der Fluoreszenzintensität der Verbindung **39** im Vergleich zum unsubstituierten Nitron **38**. Es zeigte sich auch, dass bei Zugabe der Radikalquelle keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität des Nitrons **39** eintrat. Da somit kein fluoreszenzspektroskopischer Nachweis von Radikalen mit dieser Verbindung möglich ist, wurden keine weiteren Untersuchungen mit der Verbindung **39** durchgeführt.

4.3.8 4,4-DIFLUORO-8-[4-(2,4-DINITROPHENYLNITRONO)PHENYL]1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**41**)



4.3.8.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Die Eignung des Nitrons **41** als Radikalfänger wurde durch den Abfang von Radikalen, erzeugt über die Fenton-Reaktion, mittels ESR-Spektroskopie überprüft. Die Messungen erfolgten in Benzol/DMSO (1/2 v/v), wobei jeweils 10 mM Stammlösungen der Verbindung **41** in Benzol sowie Wasserstoffperoxid und Eisen(II)chlorid in DMSO verwendet wurden. Das Verhältnis betrug Nitron **41** / H₂O₂ / Fe(II) = 5 mM / 2.5 mM / 1.7 mM. Die ESR-Untersuchung des Nitrons **41** ohne Zugabe einer Radikalquelle in Benzol/DMSO (1/1 v/v) ergab, dass nur eine sehr geringe stationäre Radikal-Konzentration vorhanden war, so dass das Signal im Geräterauschen lag. Nach Zugabe der Radikalquelle trat das für ein Nitroxid-Radikal erwartetes Signal auf (Abbildung 4-23).

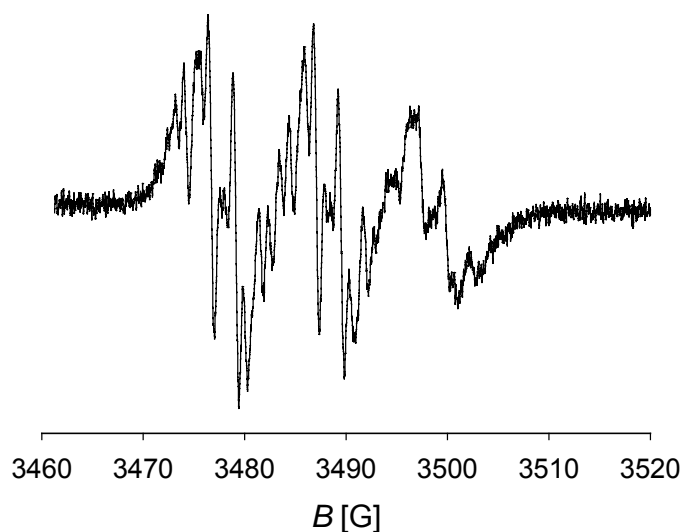


Abbildung 4-23: ESR-Spektrum des Abfangprodukts der Reaktion von **41** mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeCl}_2$ (5 mM / 2.5 mM / 1.7 mM) in Benzol/DMSO (Modulationsamplitude: 0.3 G, Mikrowellenleistung: 10 dB, Mikrowellenfrequenz: 9.8 GHz, Verstärkung: 3×10^5 , Scanzeit: 336 s, Zeitkonstante: 82 ms).

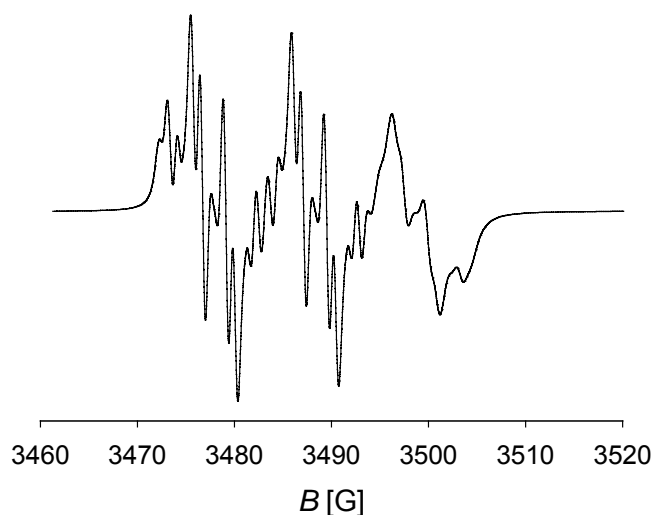
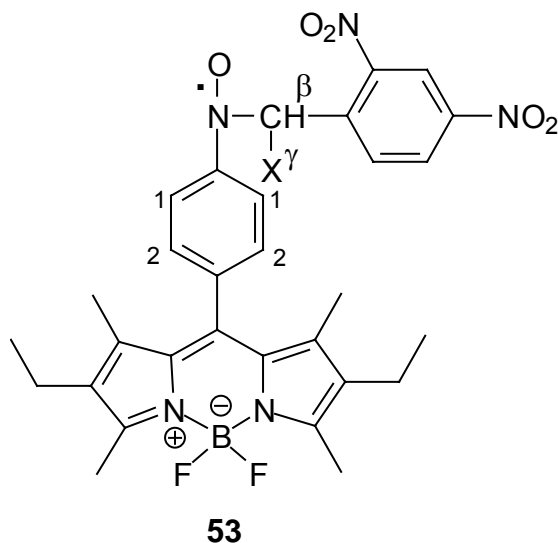


Abbildung 4-24: Simulation des ESR-Spektrums aus Abbildung 4-23.

Die Intensität des in Abbildung 4-23 gezeigten ESR-Signals der Verbindung **41** ist im Vergleich zu der unsubstituierten Verbindung **38** und der mit einer Nitro-Gruppe substituierten Verbindung **39** schwächer. Die geringere stationäre Konzentration des Nitroxid-Radikals könnte durch die Nitro-Gruppe in *ortho*-Position verursacht werden. Es besteht die Möglichkeit, dass diese durch die räumliche Nähe das Nitroxid

intramolekular reduziert. Die ESR-Untersuchung beweist, dass das Nitron **41** Radikale abfängt, welche aus der Fenton-Reaktion bzw. aus Folgereaktionen entstehen. Dabei entsteht ein Nitroxid-Radikal **53** folgender Struktur:



Die Kopplungskonstante von ^{14}N wurde mit 10.38 G bestimmt. Die Kopplungskonstanten der H^1 -, H^2 - und H^β -Kopplung betragen 2.38 G (2H), 0.89 G (2H) und 3.39 G (1H), der g -Wert 2.00576(1). Die gegenüber den vorstehend beschriebenen Spektren der Spin-Addukte **51** und **52** erhöhte β -H-Kopplung von 3.39 G lässt eine verlässliche Zuordnung zum OH-Addukt nicht mehr zu, doch spricht eine fehlende CH_3 -Aufspaltung immer noch dafür. Möglicherweise resultiert die erhöhte β -H-Kopplung aus einer intramolekularen H-Brücke zwischen der addierten OH-Gruppe und dem O-Atom der α -Nitrogruppe, wodurch die Konformation relativ starr wäre. Für die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften vor und nach Radikalabfang ist der Befund, dass das Nitron **41** die auf diesem Wege erzeugten Radikale abfängt, ausreichend.

4.3.8.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Bei den fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurde zum einen der Abfang von Isobutyronitril-Radikalen untersucht. Zudem wurde in Anlehnung an die vorangegangene ESR-Messung (4.3.8.1) der Abfang von Radikalen aus der Fenton-Reaktion bzw. Folgereaktionen untersucht.

Für die Messungen zum Isobutyronitrilradikal-Abfang wurde die Fluoreszenzmessung des Nitrons **41** in Benzol ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 551 \text{ nm}$) durchgeführt. Die Radikalerzeugung erfolgte über die thermische Zersetzung von

AIBN. Die zur Fluoreszenzmessung verwendete Lösung enthielt 10 μM **41** und 100 μM AIBN in Benzol. Sie wurde auf 100 °C (Badtemperatur) insgesamt 230 Minuten erhitzt.

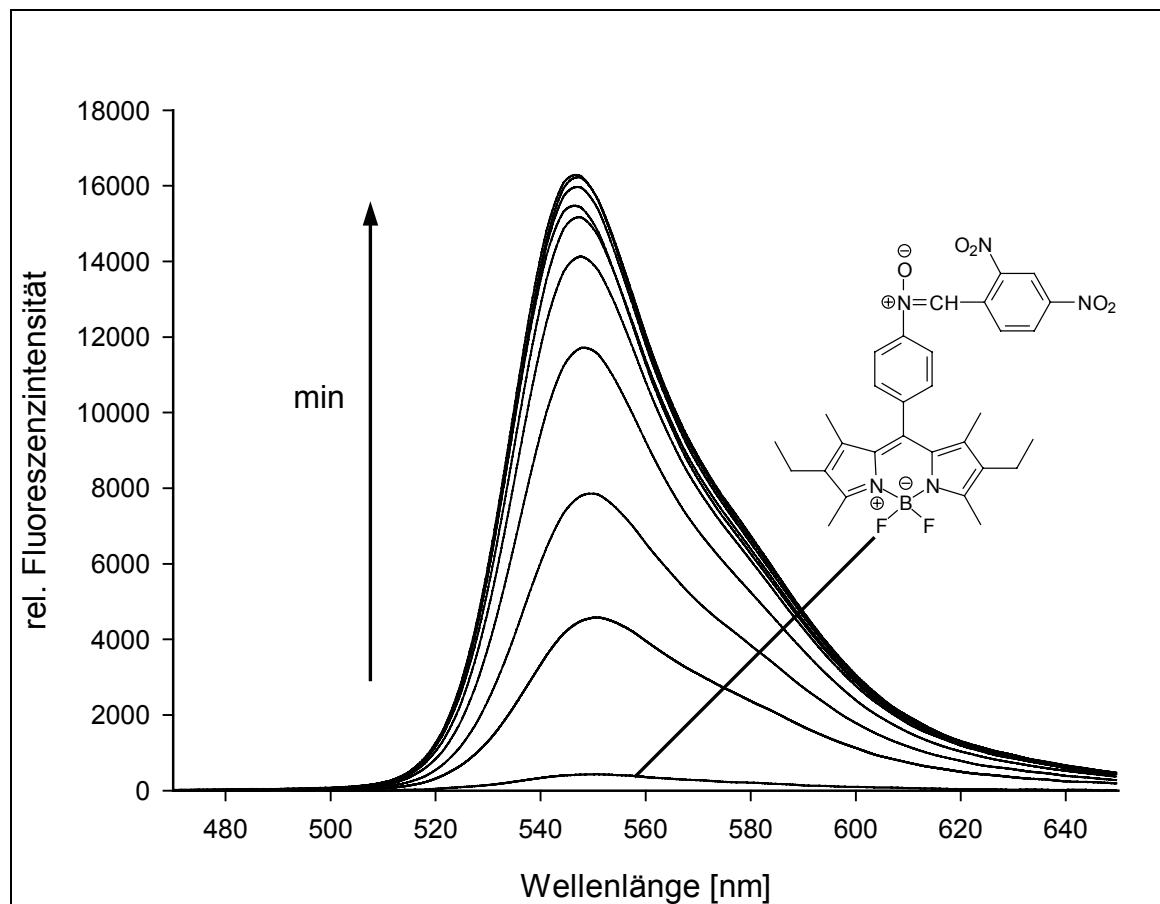


Abbildung 4-25: Fluoreszenzspektren des Nitrons **41** sowie von der Reaktion des Nitrons **41** mit Isobutyronitril-Radikalen (1:10) in Benzol (10 bis 230 min, $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Die Einführung zweier Elektronen ziehender Gruppen in σ - und p -Position zur Nitron-Einheit erbrachte die gewünschte Fluoreszenzintensitätserniedrigung im Vergleich zum unsubstituierten Nitron **38**. Das Intensitätsmaximum wurde bei der Reaktion mit Isobutyronitril-Radikalen nach 170 Minuten erreicht. Eine weitere Zugabe von 100 μM AIBN nach 200 Minuten erzeugte keinen weiteren Fluoreszenzanstieg mehr, was darauf hindeutet, dass das Nitron **41** vollständig zum fluoreszierenden Produkt umgesetzt wurde.

Nachdem der Abfang eines C-zentrierten Radikals zum erwünschten Anstieg der Fluoreszenzintensität geführt hat, wurde ebenfalls untersucht, ob auch der indirekte Nachweis der biologisch relevanten OH-Radikale durch Abfang der in DMSO entstehenden Methylradikale möglich ist. Dazu wurden 10 μM des Nitrons **41** in DMSO mit Wasserstoffperoxid und Eisen(II)chlorid im Verhältnis 1:10:10 versetzt und die Reaktion fluoreszenzspektroskopisch über einen Zeitraum von 25 Minuten verfolgt. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 4-26 dargestellt.

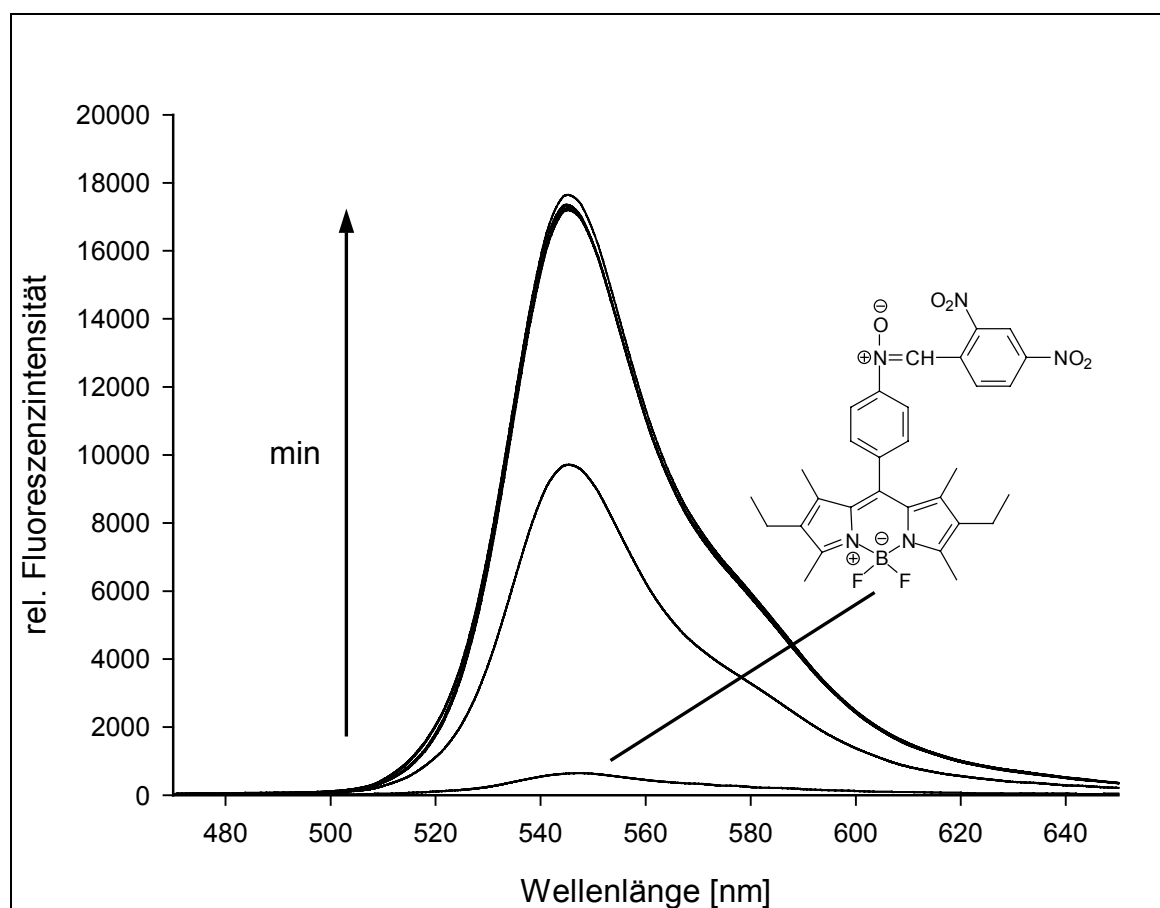


Abbildung 4-26: Fluoreszenzspektren des Nitrons **41** sowie von der Reaktion des Nitrons **41** mit OH- bzw. Methyl-Radikalen (1:10) in DMSO (0 bis 25 min).

Das Intensitätsmaximum ist bereits nach ≤ 5 Minuten erreicht. Auch nach einer weiteren Zugabe von je 100 μM Wasserstoffperoxid und Fe(II) erfolgt kein weiterer Anstieg, was darauf schließen lässt, dass das gesamte Nitron **41** zum entsprechenden Hydroxylamin umgesetzt wurde. Die größere Geschwindigkeit der Reaktion im Vergleich zur Umsetzung mit Isobutyronitril-Radikalen liegt zum einen in

der wesentlich schnelleren Generierung der Radikale über die Fenton-Reaktion und zum anderen in der praktisch diffusionskontrollierten Abreaktion der Hydroxylradikale mit DMSO zu Methylradikalen als auch in einer raschen (vermutlich diffusionskontrollierten) Addition der OH-Radikale an das Nitron. Für beide ist auch eine geringere sterische Hinderung der Radikal-Addition im Vergleich zum Isobutyronitril-Radikal von Vorteil.

4.3.8.3 Untersuchung der Reduktionsempfindlichkeit

Die Reduktionsempfindlichkeit der potentiellen Radikalsonde **41** wurde im zellfreien System durch Zugabe verschiedener, in der Zelle auftretender Reduktionsmittel untersucht. Dabei wurden 10 μM des Nitrons **41** mit unterschiedlichen Konzentrationen von 2-100 μM des jeweiligen Reduktionsmittels (Ascorbinsäure, NADH, Glutathion und Glucose) versetzt. In den Abbildungen 4-27 bis 4-30 sind die kontinuierlichen Fluoreszenzmessungen dargestellt.

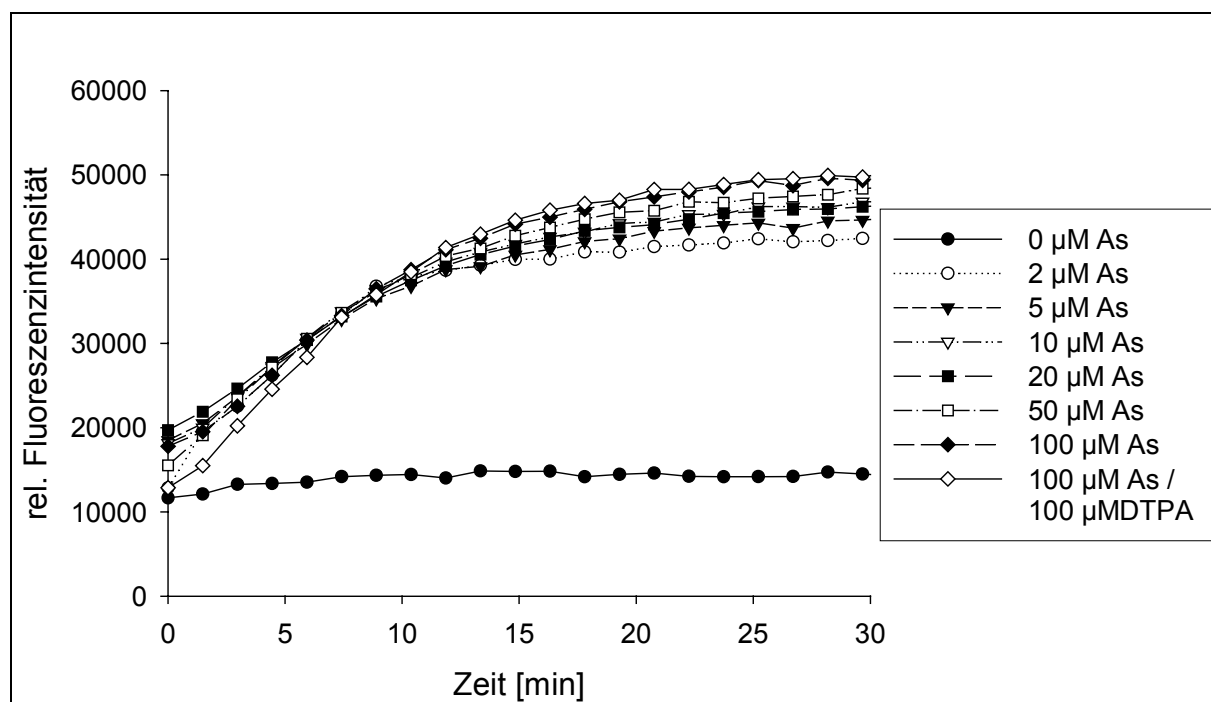


Abbildung 4-27: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung der Reaktion des Nitrons **41** (10 μM) mit Ascorbinsäure (2-100 μM).

Hierbei wird deutlich, dass schon geringste Mengen an Ascorbinsäure ausreichen, um das gering fluoreszierende Nitron **41** zum fluoreszierenden Hydroxylamin zu reduzieren. Die Zugabe von DTPA als Eisen(II)-Chelator sollte hier sicherstellen, dass die Zunahme der Fluoreszenz nicht durch Radikalabfang (Eisen-induzierte Radikalbildung) verursacht wurde.

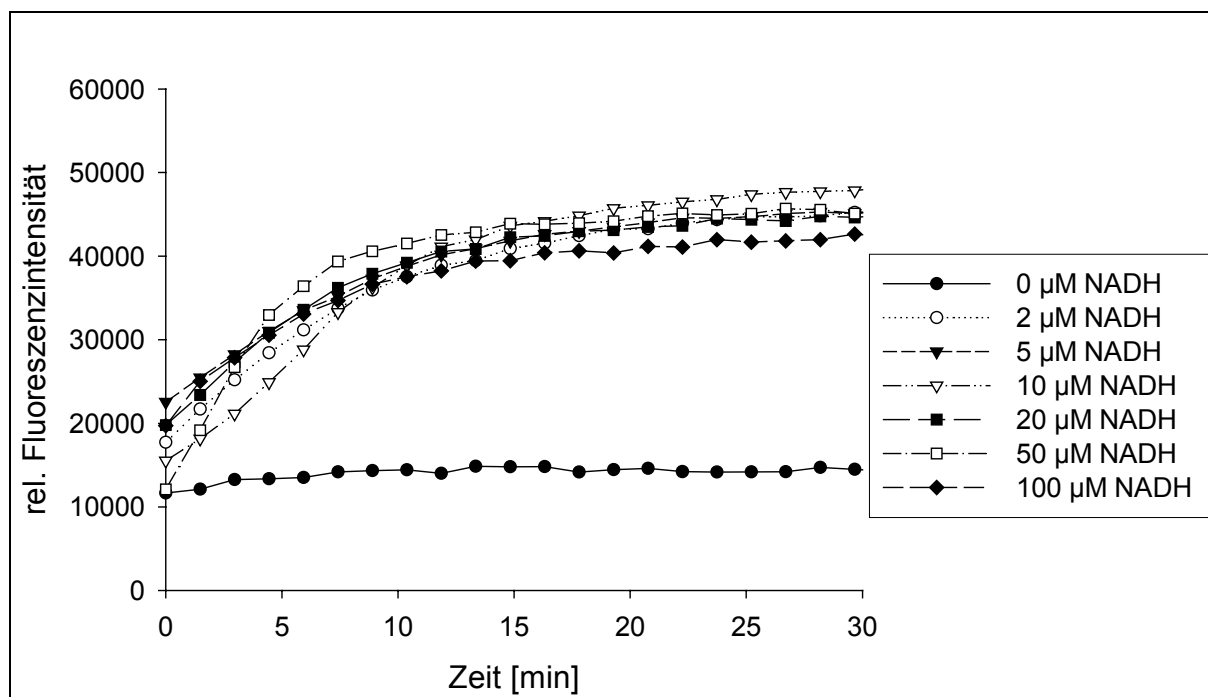


Abbildung 4-28: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung der Reaktion des Nitrons **41** (10 µM) mit NADH (2-100 µM).

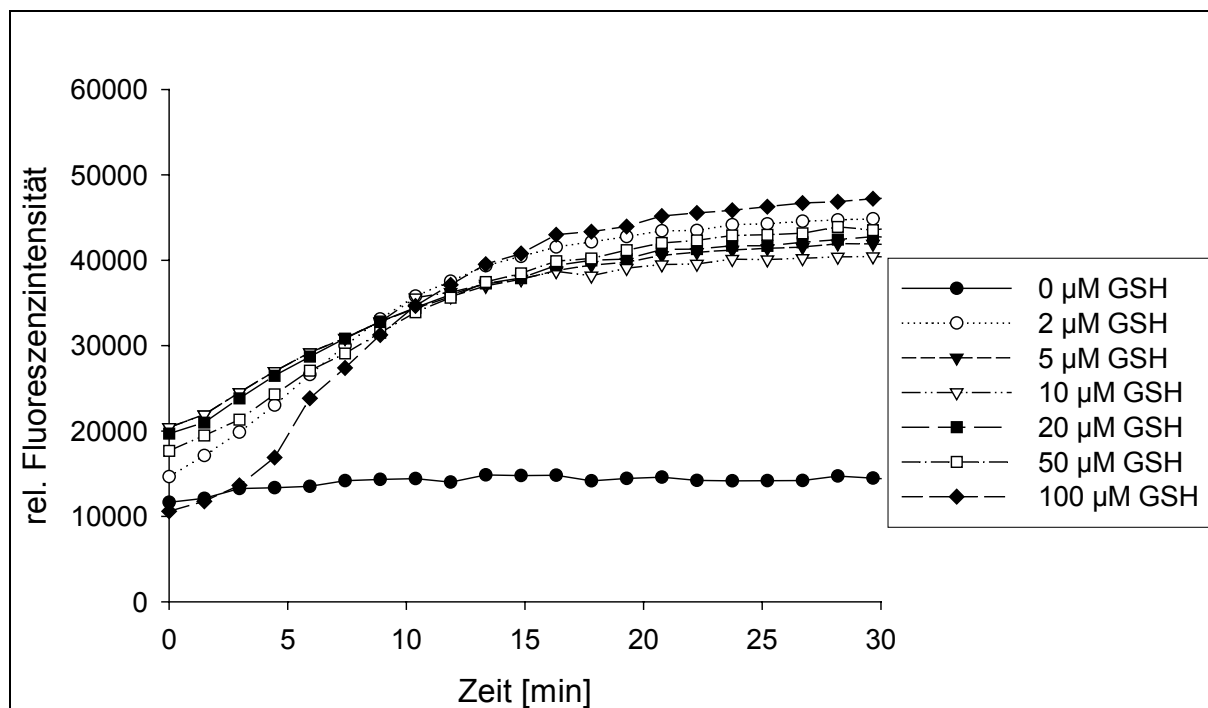


Abbildung 4-29: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung der Reaktion des Nitrons **41** (10 µM) mit Glutathion (2-100 µM).

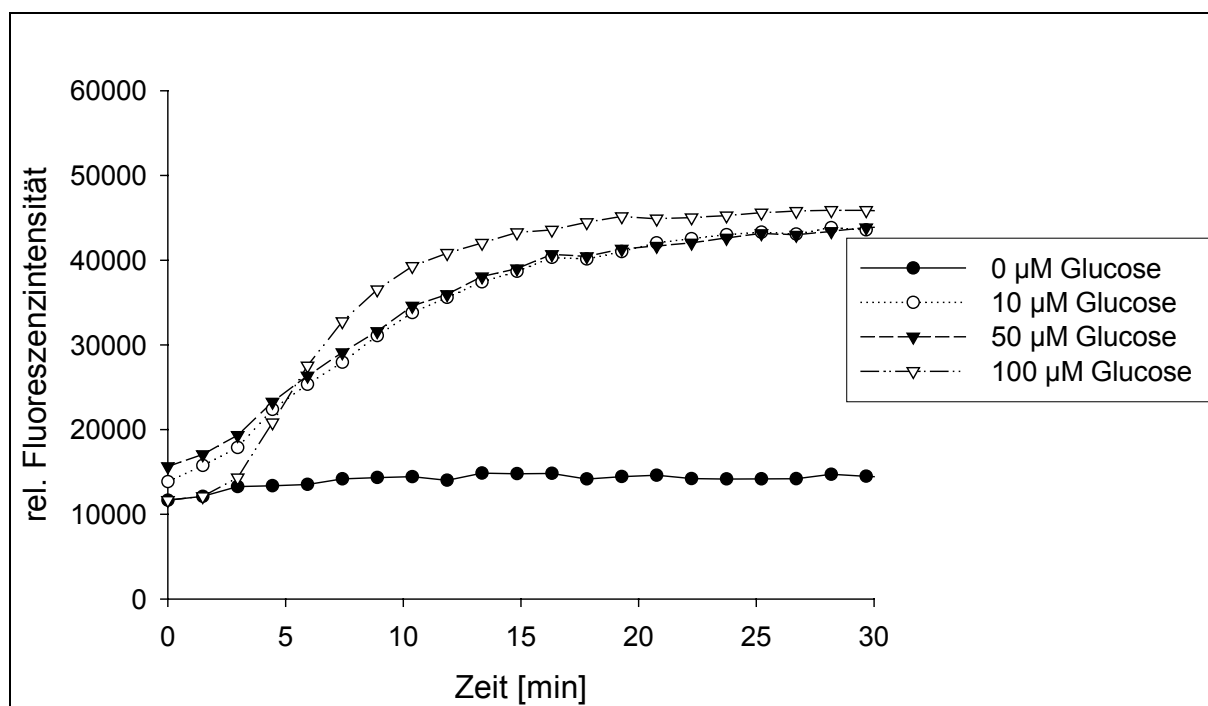


Abbildung 4-30: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung der Reaktion des Nitrons **41** (10 µM) mit Glucose (10-100 µM).

Insgesamt zeigt das Nitron **41** bei allen vier Reduktionsmitteln in allen Konzentrationen eine deutliche Reduktionsempfindlichkeit. Im allgemeinen sind Nitrone nicht derart gute Oxidationsmittel. Hier findet sich jedoch eine Besonderheit: die in *ortho*- und *para*-Position konjugierten Elektronen ziehenden Gruppen bewirken neben der erwünschten Fluoreszenzintensitätserniedrigung eine Stabilisierung der reduzierten Form des Nitrons. Die in Abbildung 4-31 dargestellte negative Ladung nach Aufnahme eines Elektrons und somit Bildung eines Aminoxy-Anionradikals kann durch die verstärkte Elektronenakzeptor-Wirkung des substituierten Phenylrings optimal delokalisiert werden.^[52] Dadurch sinkt die Energiebarriere der Reduktion deutlich, wodurch die Verbindung **41** für eine Anwendung in der lebenden Zelle ungeeignet ist und daher nicht weiter untersucht wurde.

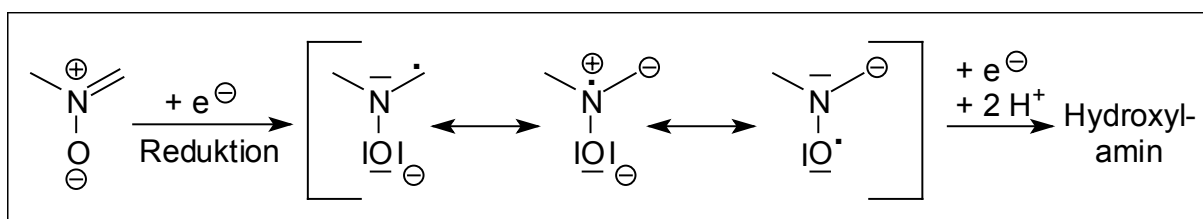
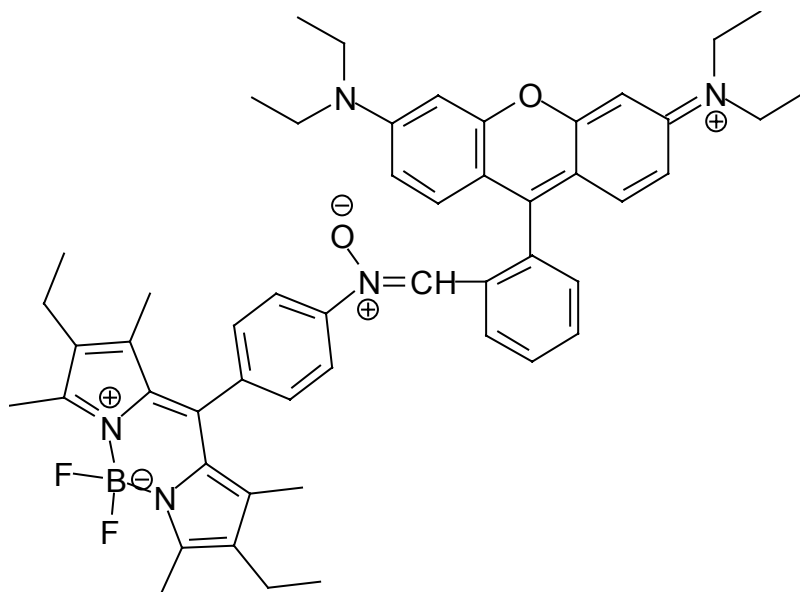


Abbildung 4-31: Reduktion eines Nitrons über ein Aminoxy-Anionradikal zum Hydroxylamin.

4.3.9 4,4-DIFLUORO-8-(4-PHENYLNITRONO-RHODAMIN B)-1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**43**)



4.3.9.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Die Eignung der Verbindung **43** als Radikalfänger wurde mittels ESR-Spektroskopie untersucht. Die Radikale wurden dabei über die Fenton-Reaktion erzeugt, wobei das Verhältnis Nitron **43** / H₂O₂ / Fe(II) = 5 mM / 2.5 mM / 1.7 mM betrug. Die Messungen erfolgten in Benzol/DMSO (1/2 v/v). Dabei wurden Stammlösungen von 10 mM der Verbindung **43** in Benzol und jeweils 10 mM Wasserstoffperoxid und Eisen(II)chlorid in DMSO verwendet. Wie bei den zuvor untersuchten Radikalfängern wurde auch hier zunächst eine ESR-Untersuchung der Verbindung **43** ohne Zugabe einer Radikalquelle in Benzol/DMSO (1/1 v/v) durchgeführt. Hierbei wurde deutlich, dass bereits eine niedrige stationäre Konzentration von Radikalen vorhanden ist (Abbildung 4-32).

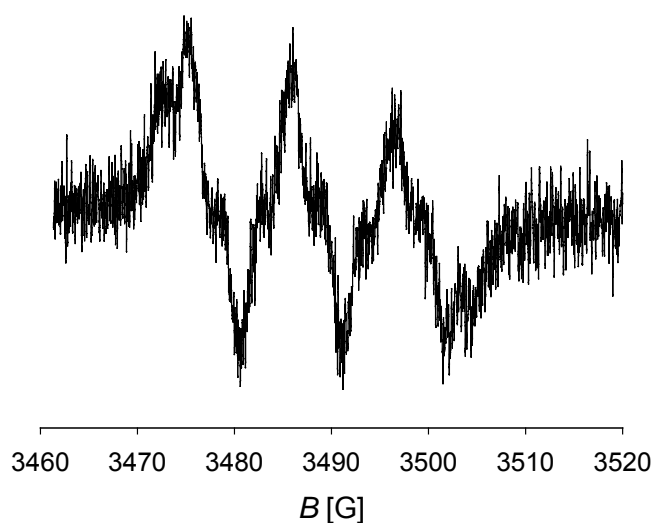


Abbildung 4-32: ESR-Spektrum des „Untergrund“-Radikals im Nitron **43** in Benzol (Modulationsamplitude: 0.3 G, Mikrowellenfrequenz: 9.8 GHz, Mikrowellenleistung: 10 dB, Verstärkung: 3×10^5 , Scanzeit: 336 s, Zeitkonstante: 81.9 ms).

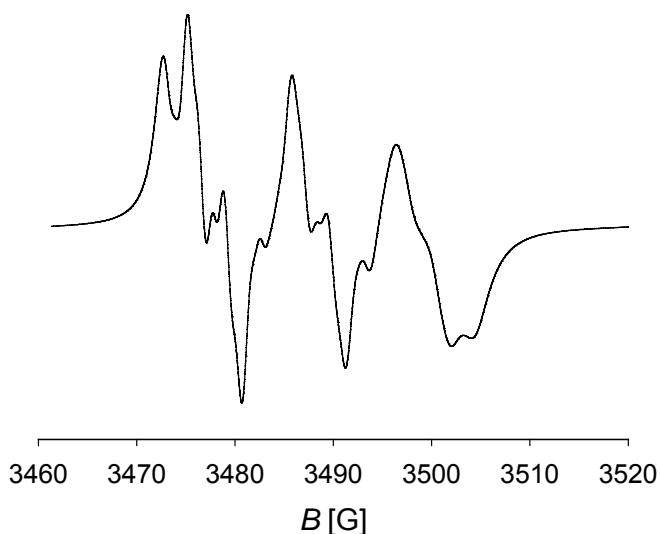
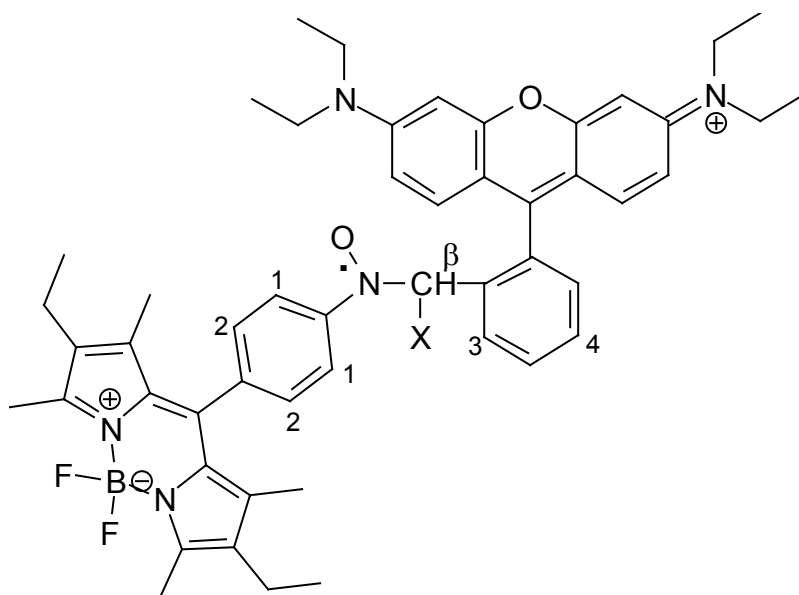


Abbildung 4-33: Simulation des ESR-Spektrums aus Abbildung 4-32.

Hierbei fällt die im Vergleich zu den ESR-Signalen der Verbindungen **38**, **39** und **41** relativ großen Linienbreite auf. Da die sonstigen Messbedingungen wie Lösungsmittel etc. konstant gehalten wurden, könnte diese Verbreiterung auf den Einfluss des Rhodamins zurückzuführen sein. Mittels ESR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem „Untergrund“-Radikal um ein Nitroxid-Radikal **54** mit folgender Struktur handelt:



54

Eine eindeutige Identifizierung der Gruppe X war nicht möglich. Die ermittelten Kopplungskonstanten und der g -Wert sind in Tabelle 4-5 aufgeführt. Im Anschluss daran erfolgte die Untersuchung zum Abfang von OH- bzw. Methyl-Radikalen durch das Nitron **43**. In Abbildung 4-34 ist das entsprechende ESR-Signal nach Reaktion mit $\text{FeCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ in Benzol/DMSO dargestellt.

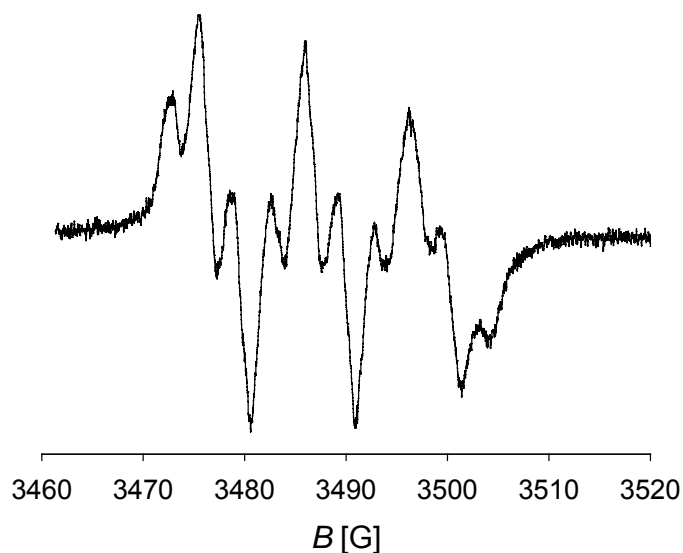


Abbildung 4-34: ESR-Spektrum des Abfangprodukts der Reaktion von **43** mit $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeCl}_2$ (5 mM / 2.5 mM / 1.7 mM) in Benzol/DMSO (1/2 v/v) (Modulationsamplitude: 0.3 G, Mikrowellenfrequenz: 9.8 GHz, Mikrowellenleistung: 10 dB, Verstärkung: 3×10^5 , Scanzeit: 336 s, Zeitkonstante: 81.9 ms).

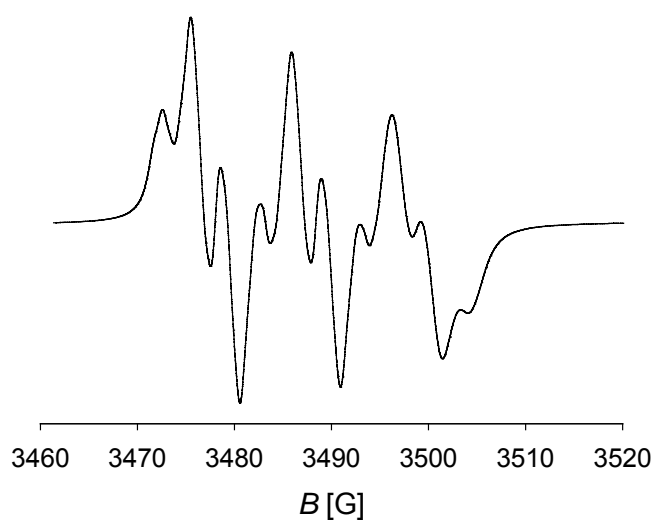
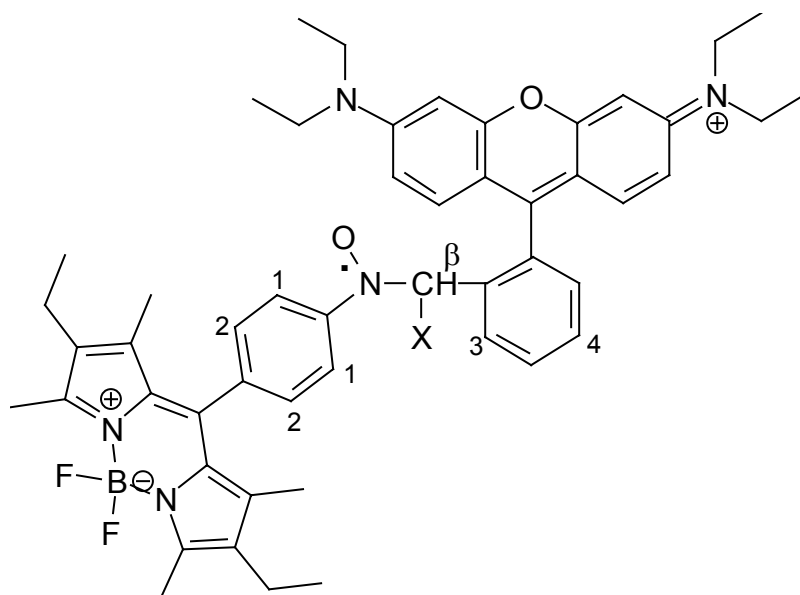


Abbildung 4-35: Simulation des ESR-Spektrums aus Abbildung 4-34.

In Tabelle 4-6 sind die ermittelten Kopplungskonstanten und der g -Faktor des Nitroxid-Radikals aus Abbildung 4-34 sowie des „Untergrund“-Radikals aus Abbildung 4-32 zusammengefasst.

Tabelle 4-6: Ermittelte Kopplungskonstanten und g -Werte der Nitroxid-Radikale aus den Abbildungen 4-32 und 4-34.

Radikal	$a(N)$ [G]	$a(H^1)$ [G]	$a(H^2)$ [G]	$a(H^\beta)$ [G]	$a(H^3)$ [G]	$a(H^4)$ [G]	g -Wert
„Untergrund“- Radikal	10.54	2.69 (2H)	1.02 (2H)	3.37 (1H)	0.01 (1H)	1.02 (1H)	2.00583 (5)
$\bullet OH/\bullet CH_3$	10.38	2.53 (2H)	0.77 (2H)	3.70 (1H)	0.01 (1H)	0.87 (1H)	2.00578 (1)



54

Die angegebenen H^3 - und H^4 -Kopplungen sind Näherungswerte aus den Simulationen und konnten aufgrund der Linienbreite im ESR-Spektrum nicht beobachtet werden. Die Signalintensität des Spin-Adduktes (Abbildung 4-34) ist im Vergleich zum Signal des bereits in der Verbindung vorhandenen Nitroxid-Radikals (Abbildung 4-32) stark erhöht. Dies zeigt, dass das Nitron **43** Radikale abfängt, welche aus der Fenton-Reaktion bzw. aus Folgereaktionen entstehen. Eine Zuordnung der Gruppe X zum OH- oder CH_3 -Addukt ist aufgrund fehlender weiterer Aufspaltungen nicht möglich. Der durch das verwendete Lösungsmittelgemisch Acetonitril/Wasser (3/1 v/v) auftretende Anisotropieeffekt führte zu verbreiterten Signalen, welche eine Auflösung kleinerer Aufspaltungen nicht zuließ. Die ESR-Untersuchung hat jedoch gezeigt, dass die Verbindung **43** prinzipiell als Radikal-Fänger geeignet ist. Für die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften vor und nach Radikalabfang ist somit sicher gestellt, dass das Nitron **43** die Radikale abfängt, die auf diesem Weg erzeugt werden.

4.3.9.2 UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die UV/Vis-Spektren wurden in Chloroform mit einer Konzentration von jeweils 5 μ M Nitron aufgenommen.

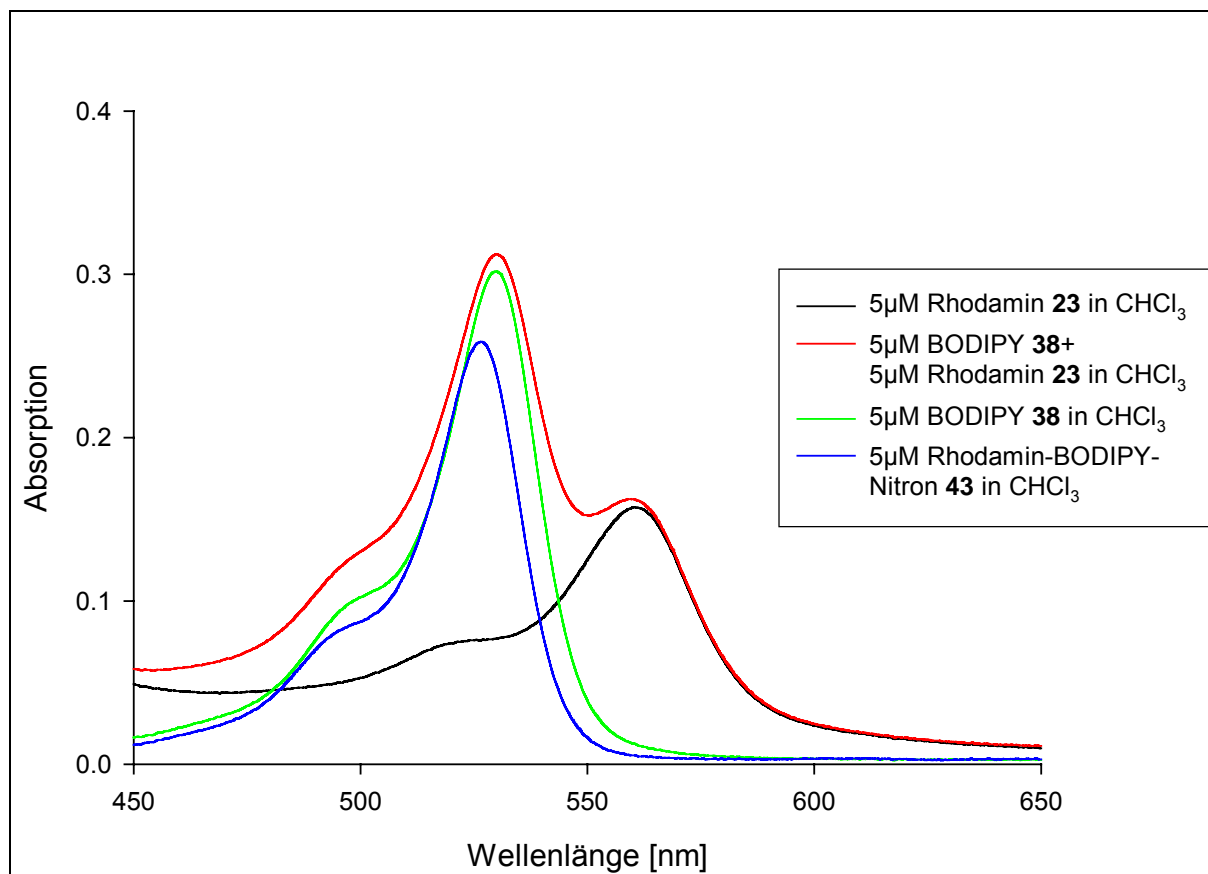


Abbildung 4-36: Absorptionsspektren des Rhodamin-Nitrons **23** (5 μ M), des BODIPY-Nitrons **38** (5 μ M), des BODIPY-Rhodamin-Nitrons **43** (5 μ M) sowie einer 1/1-Mischung der Nitrone BODIPY **38**/Rhodamin **23** = 5 μ M/5 μ M in Chloroform.

Abbildung 4-36 zeigt die erhaltenen Absorptionsspektren. Das Absorptionsmaximum des BODIPY's **38** liegt bei $\lambda_{\text{max}} = 530$ nm, das Absorptionsmaximum des Rhodamins **23** bei $\lambda_{\text{max}} = 561$ nm. Während bei dem 1/1-Gemisch BODIPY **38**/ Rhodamin **23** ein Absorptionsspektrum erhalten wurde, welches wie zu erwarten die Addition der beiden einzelnen Spektren zeigte, wies das Spektrum des Nitrons **43**, in welchem beide Fluorophore kovalent gebunden vorliegen, lediglich das Absorptionsprofil des BODIPY's auf.

Die Fluoreszenzmessung von Verbindung **43** ergab ein Absorptionsmaximum bei 520 nm und ein Fluoreszenzmaximum bei 541 nm in DMSO, was den Werten des freien BODIPY-Fluorophors entspricht. Die Radikale wurden hier – wie auch bei den ESR-Messungen – über die Fenton-Reaktion erzeugt. Dabei wurde bei einem Verhältnis von Nitron **43** (10 μ M) / Wasserstoffperoxid / Fe(II)chlorid von 1:10:10 und

1:20:20 gemessen. Durch das verwendete Lösungsmittel DMSO kann davon ausgegangen werden, dass OH- und/oder CH₃-Radikale abgefangen wurden. Es konnte allerdings weder eine Wellenlängenverschiebung noch eine signifikante Intensitätsänderung festgestellt werden. Auch bei Variation der Anregungswellenlänge wurde ausschließlich das Emissionsprofil des BODIPY's erhalten. In Abbildung 4-37 ist das Fluoreszenzspektrum des Nitrons **43** sowie die Spektren nach Abfang der Radikale dargestellt ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$).

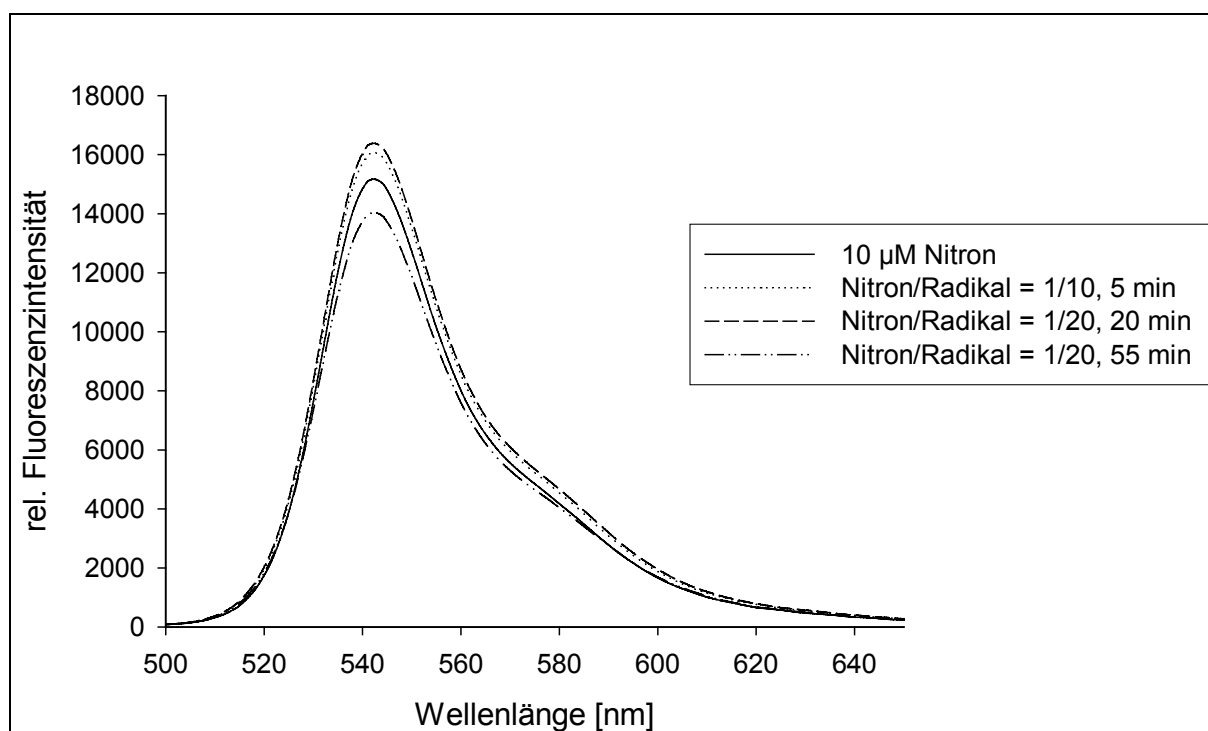


Abbildung 4-37: Fluoreszenzspektren des Nitrons **43** sowie von der Reaktion des Nitrons **43** mit Radikalen (1:10 und 1:20) in DMSO ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$, Messung nach 5, 20 und 55 Minuten nach Zugabe der Radikalquelle/Fenton).

Eine Fluoreszenzniedrigung oder -löschung der Emissionswellenlänge des BODIPY-Fluorophors trat nicht ein. Eine Emission bei der Wellenlänge des Rhodamins (als Akzeptor, $\lambda_{\text{exc}} = 555 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 584 \text{ nm}$ in DMSO) konnte weder vor noch nach Radikalabfang beobachtet werden. Zum Vergleich wurden die Fluoreszenzspektren (in Chloroform) des BODIPY's **38** ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, rel. Fluoreszenzintensität ≈ 39000 bei $\lambda_{\text{em}} = 544 \text{ nm}$), des Rhodamins **23** ($\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$, rel. Fluoreszenzintensität ≈ 10000 bei $\lambda_{\text{em}} = 577 \text{ nm}$), des Rhodamin-BODIPY-Nitrons

43 sowie eines 1/1-Gemisches von BODIPY **38**/ Rhodamin **23** bei $\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$ gemessen. Die Konzentration der Nitrone betrug jeweils $5 \mu\text{M}$ in Chloroform.

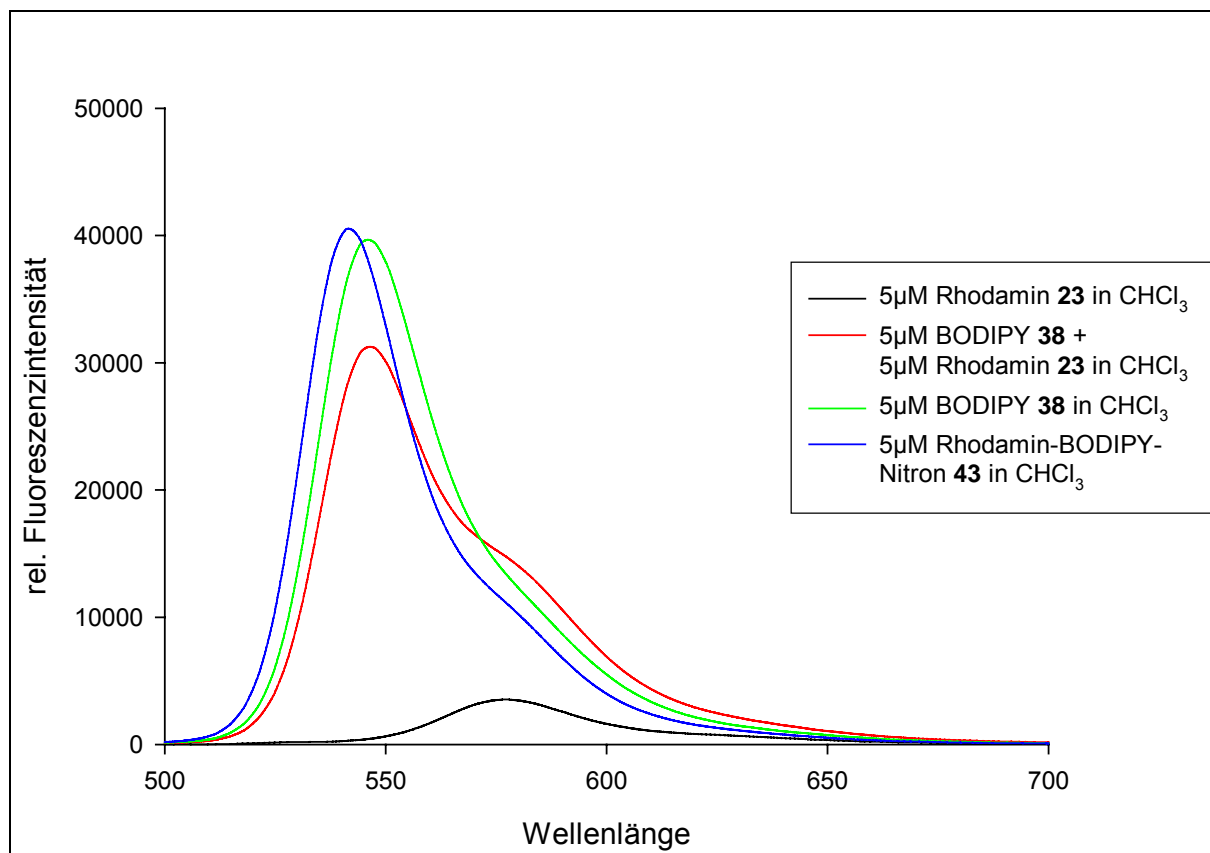


Abbildung 4-38: Emissionsspektren des Rhodamin-Nitrons **23** ($5 \mu\text{M}$), des BODIPY-Nitrons **38** ($5 \mu\text{M}$), des BODIPY-Rhodamin-Nitrons **43** ($5 \mu\text{M}$) sowie einer 1/1-Mischung der Nitrone BODIPY **38**/Rhodamin **23** = $5 \mu\text{M}/5 \mu\text{M}$ in Chloroform.

Das Rhodamin-BODIPY-Nitron **43** weist ein ähnliches Emissionsspektrum wie das BODIPY **38** auf ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$, rel. Fluoreszenzintensität ≈ 40000 bei $\lambda_{\text{em}} = 541 \text{ nm}$). Auch nach einer Anregung im Absorptionsbereich des Rhodamin-Fluorophors ($\lambda_{\text{exc}} = 545 \text{ nm}$) wurde ebenfalls nur das Emissionsspektrum des BODIPY-Fluorophors ($\lambda_{\text{em}} = 544 \text{ nm}$) mit einer entsprechend geringeren Intensität erhalten (nicht abgebildet). Aufgrund der Anregung im Absorptionsmaximum des BODIPY's **38** ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm}$) ist die relative Fluoreszenzintensität (≈ 39000 bei $\lambda_{\text{em}} = 544 \text{ nm}$) etwa 10 mal höher als die des Rhodamins **23** (rel. Fluoreszenzintensität ≈ 4000 bei $\lambda_{\text{em}} = 577 \text{ nm}$). Aber auch die Anregung im Absorptionsmaximum des Rhodamins **23** ($\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$) führt nur zu einer relativen Fluoreszenzintensität von etwa 10000 bei

$\lambda_{em} = 577 \text{ nm}$. Eventuell sind die unterschiedlich großen Fluoreszenzquantenausbeuten Ursache dafür, dass bei einer 1/1-Mischung beider Fluorophore (jeweils $5 \mu\text{M}$ in Chloroform) der FRET-Effekt nur geringfügig ausgeprägt ist. Die Anregung bei 525 nm (Absorptionsmaximum des BODIPY's **38**) führt im Gemisch zu einer Verringerung des BODIPY-Emissionsmaximums ($\lambda_{em} = 544 \text{ nm}$) sowie zur Bildung einer „Schulter“ im Bereich des Rhodamin-Emissionsmaximums ($\lambda_{em} = 577 \text{ nm}$), also einer Erhöhung der Emission des Rhodamins **23**. Dies zeigt, dass der FRET-Effekt bei Vorliegen der „freien“ Fluorophore zwar schwach, aber wie erwartet eintritt (Effizienz $E = 0.2$, Vgl. S.21 Gleichung 10), jedoch bei Konjugation beider Fluorophore im Nitron **43** ausbleibt ($E = 0$). Wahrscheinlich ist im Molekül **43** die Geschwindigkeit der Energieübertragung $k_T(r)$ zwischen den beiden konjugierten Fluorophoren kleiner als die Lebensdauer τ_D des Donors BODIPY.

Eine mögliche Ursache dafür, dass die Fluoreszenzspektren des Nitrons **43** vor und nach Radikalabfang nur eine geringfügige Änderung der Intensität aufweisen, könnte an der C-Anbindung der Nitron-Gruppe an das Rhodamin (*ortho*-Position) liegen. In dieser Position könnte ein zu geringer Einfluss auf das fluorophore System (Rhodamin) herrschen, so dass eine Energieübertragung über PET nicht möglich ist. Ein Energieaustausch über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (FRET) zwischen beiden Fluorophoren scheint ebenfalls weder vor noch nach Radikalabfang stattzufinden, so dass keine ausreichende Verschiebung ($> 50 \text{ nm}$) der Emissionswellenlänge erfolgt. Bislang ist wenig über die Abhängigkeit des FRET-Effektes vom Orientierungsfaktor κ^2 bekannt. In diesem Fall könnte eine für den Energietransfer ungünstige Anordnung der Fluorophore Ursache dafür sein, dass weder vor (π -Bindung, Nitron) noch nach Radikalabfang (σ -Bindung, Hydroxylamin) der FRET-Effekt im Molekül auftritt. In Abbildung 4-39 und 4-40 sind die energieminierten Strukturen des Nitrons **43** und des nach Abfang zweier Methyl-Radikale entstehenden Methylhydroxylamins dargestellt.

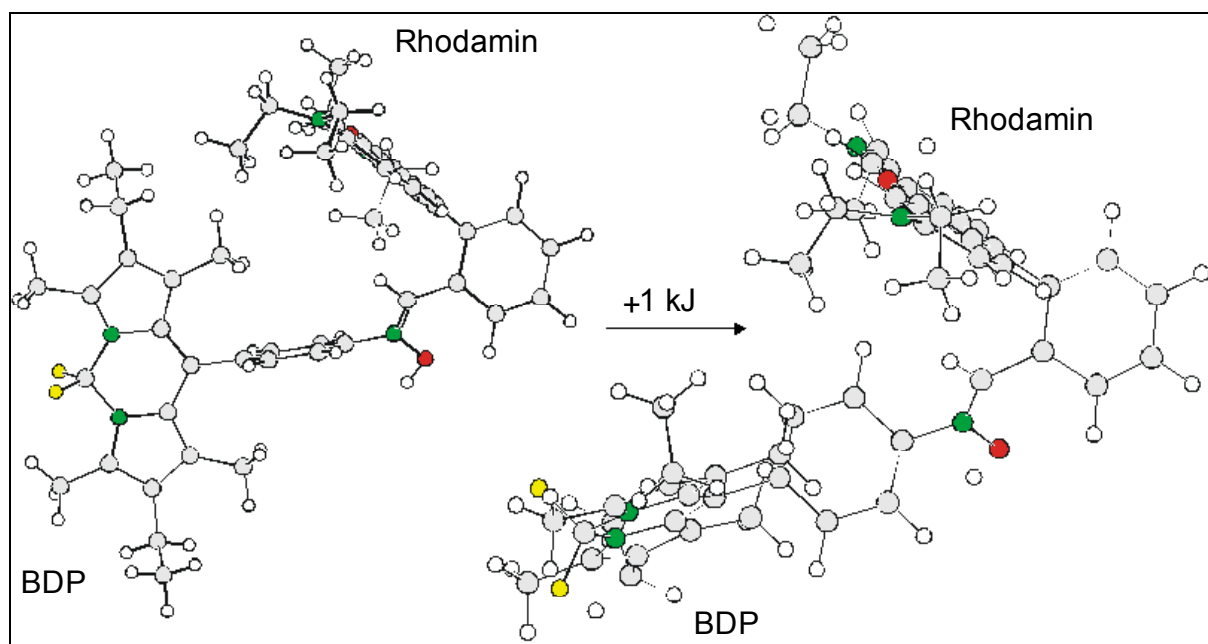


Abbildung 4-39: Energieminimierte Strukturen (*molecular modeling*, Abschnitt 7.1): Abstand und relative Orientierung der Übergangsdipolmomente im Nitron **43** (C=N-Doppelbindung).

Zwischen den in Abbildung 4-39 dargestellten energieminierten Strukturen des Nitrons **43** besteht eine Energiedifferenz von 1 kJ. Wahrscheinlich liegen diese beiden Konformere der Verbindung **43** bei Raumtemperatur vor. Im linken Konformer liegen die π -Systeme der Fluorophore senkrecht aufeinander, im rechten Konformer in einem Winkel von etwa 60° .

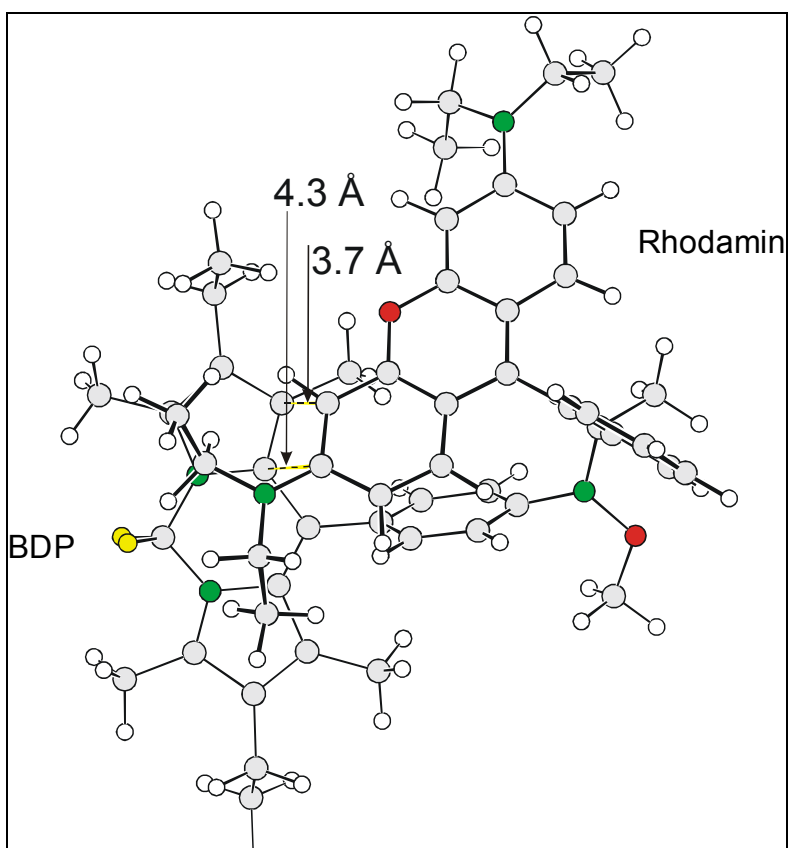
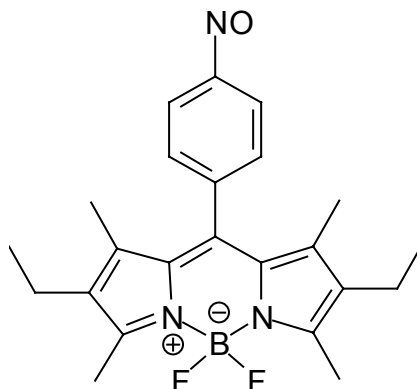


Abbildung 4-40: Energieminimierte Strukturen (*molecular modeling*, Abschnitt 7.1): Abstand und relative Orientierung der Übergangsdipolmomente im Alkylhydroxylamin (C-N-Einfachbindung).

Abbildung 4-40 zeigt die energieminimierte Struktur des Methylhydroxylamins. Hier stehen die π -Systeme der Fluorophore mit einem Abstand von 3.7-4.3 Å zwar parallel zueinander, jedoch seitlich verdreht, so dass eventuell aus diesem Grund keine Energieübertragung vom BODIPY- auf das Rhodamin-Fluorophor über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen stattfinden kann.

Da nach Radikalabfang kein Unterschied im Fluoreszenzverhalten des Abfangproduktes zum Nitron **43** festgestellt werden konnte, ist das Nitron **43** zur Detektion von Radikalen ungeeignet.

4.3.10 4,4-DIFLUORO-8-(4-NITROSOPHENYL)1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**45**)



4.3.10.1 Untersuchung der Eignung als Radikalfänger

Eine 10 mM Lösung von Verbindung **45** in Benzol wurde zum einen mit Azoisobutyronitril (AIBN) und zum anderen mit Di-*tert.*-Butylperoxid (DTBP) versetzt und ESR-spektroskopisch untersucht. Die Erzeugung der Radikale erfolgte photolytisch. Das Verhältnis bei den Messungen betrug **45** / AIBN = 1:10 bzw. **45** / DTBP = 1:10 (10 mM / 100 mM). Eine kontinuierliche Bestrahlung der Nitroso-Verbindung **45** ohne Zugabe einer Radikalquelle zeigte, dass bereits Radikale in der Probe vorhanden sind. Das Signal wurde mit der Dauer der Bestrahlung intensiver. Dies ist jedoch für viele Radikalfänger typisch und beeinträchtigt die weiteren Untersuchungen nicht. In Abbildung 4-41 ist das erhaltene ESR-Signal dargestellt.

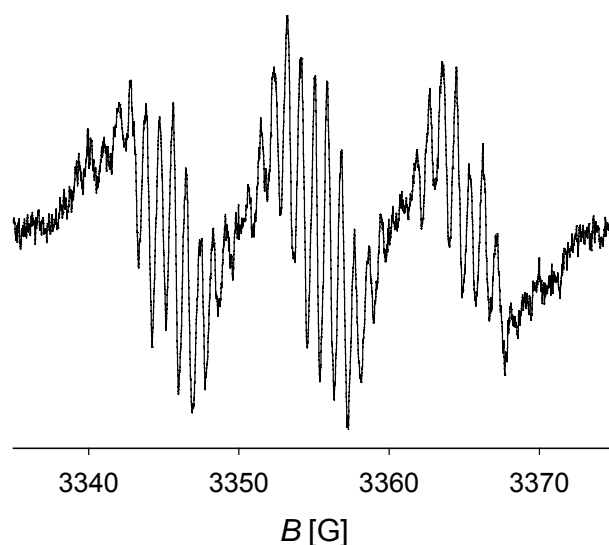


Abbildung 4-41: ESR-Spektrum der Verbindung **45** in Benzol bei kontinuierlicher UV-Photolyse (Experimentelle Bedingungen: Verstärkung: 4×10^6 ; Scanzeit: 2 ks; Zeitkonstante: 0.5 s, Modulationsamplitude: 0.2 G, Mikrowellenleistung: 10 dB, Mikrowellenfrequenz: 9.4 GHz, Strahlungsquelle: Hg/Xe-Lampe (1 kW) mit UG5-Filter).

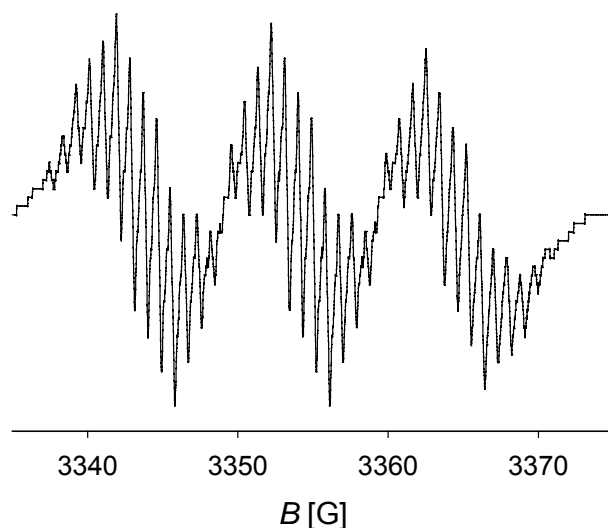
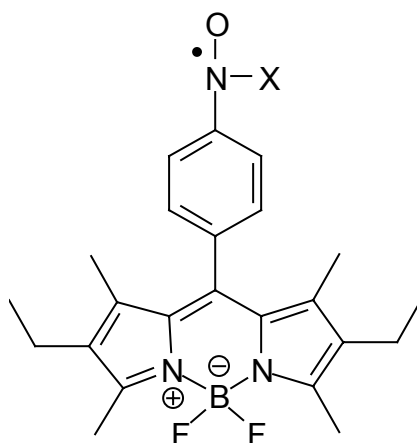


Abbildung 4-42: Simulation des ESR-Spektrums aus Abbildung 4-41.

Die asymmetrischen Signale sprechen dafür, dass wahrscheinlich mindestens zwei Spezies vorhanden sind, deren Signale übereinander liegen. Aus dem ESR-Spektrum lässt sich entnehmen, dass es sich um Nitroxid-Radikale handelt, welche folgende Struktur aufweisen:



55

Eine Identifizierung der Gruppe X ist nicht möglich. Der aus dem Spektrum erhaltene g-Wert sowie die ^{14}N -Kopplungskonstante (Simulation) dieses „Untergrund“-Radikals sind in Tabelle 4-6 aufgeführt.

Im Anschluss erfolgte eine kontinuierliche Bestrahlung des Nitroso-BODIPY's **45** nach Zugabe der Radikalquelle AIBN. Das erhaltene ESR-Spektrum sowie die Simulation sind in den Abbildungen 4-43 und 4-44 dargestellt.

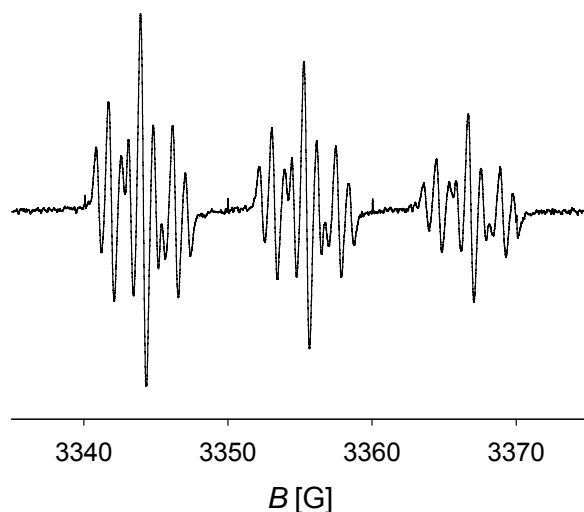


Abbildung 4-43: ESR-Spektrum des Abfangprodukts der Reaktion von **45** mit AIBN (1:10) in Benzol (kontinuierliche UV-Photolyse, Experimentelle Bedingungen: Verstärkung: 1.25×10^6 ; Scanzeit: 1 ks; Zeitkonstante: 0.2 s, Modulationsamplitude: 0.2 G, Mikrowellenleistung: 10 dB, Mikrowellenfrequenz: 9.4 GHz, Strahlungsquelle: Hg/Xe-Lampe (1 kW) mit UG5-Filter).

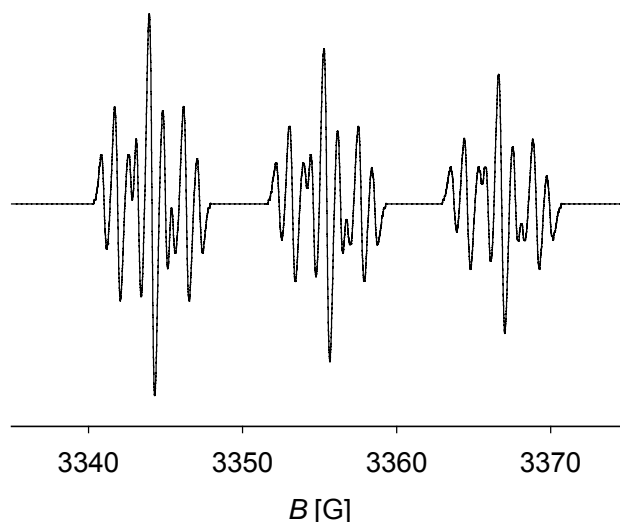
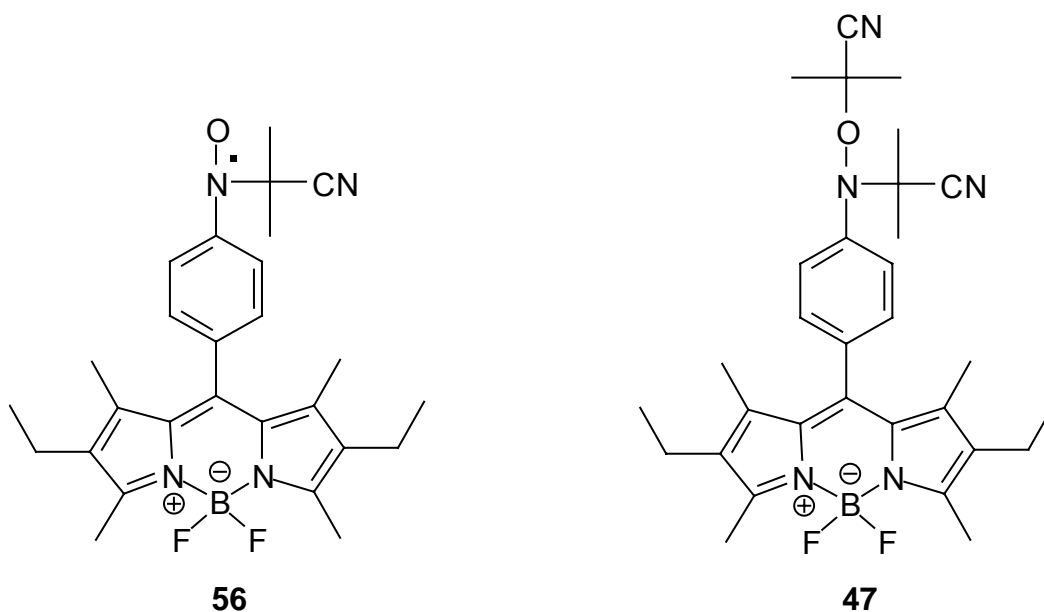


Abbildung 4-44: Simulation des ESR-Spektrums aus Abbildung 4-43.

Das ESR-Spektrum zeigt, dass das Spin-Addukt **56** mäßig stabil ist und langsam abreagiert. In Tabelle 4-6 sind die Kopplungskonstanten und der g-Wert des Spin-Adduktes **56** aufgeführt. Durch Reaktion mit einem weiteren Isobutyronitril-Radikal entsteht 2-((Cyano-dimethyl-methoxy)-[4-(2,6-diethyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-3a,4a-di-aza-4-bora-s-indacen-8-yl)-phenyl]-amino} –2-methyl-ropionitrile **47**, was mittels ESI-TOF nachgewiesen werden konnte. Das Nitroso-BODIPY **45** ist dagegen nicht mehr nachzuweisen.



HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

berechnet (für $C_{31}H_{38}BF_2N_5ONa$) : 568.3035 [M(**47**) + Na]

gefunden : 568.3043

Abweichung : 1.41 ppm

Die Reaktion der Nitroso-Verbindung **45** mit Di-*tert.*-Butylperoxid (DTBP) als Radikalquelle erfolgte ebenfalls durch kontinuierliche Bestrahlung. Abbildung 4-45 zeigt das erhaltene ESR-Spektrum, Abbildung 4-46 die entsprechende Simulation.

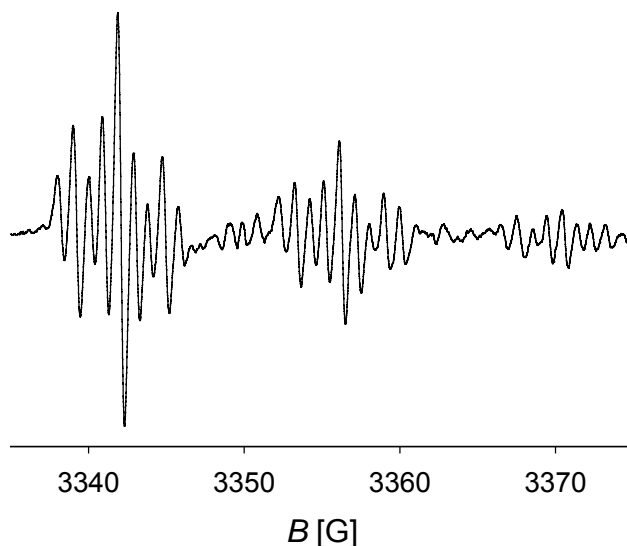


Abbildung 4-45: ESR-Spektrum des Abfangprodukts der Reaktion von **45** mit DTBP (1:10) in Benzol (kontinuierliche UV-Photolyse, Experimentelle Bedingungen: Verstärkung: 5.00×10^6 ; Scanzeit: 1 ks; Zeitkonstante: 0.2 s, Modulationsamplitude: 0.2 G, Mikrowellenleistung: 10 dB, Mikrowellenfrequenz: 9.4 GHz, Strahlungsquelle: Hg/Xe-Lampe (1 kW) mit UG5-Filter).

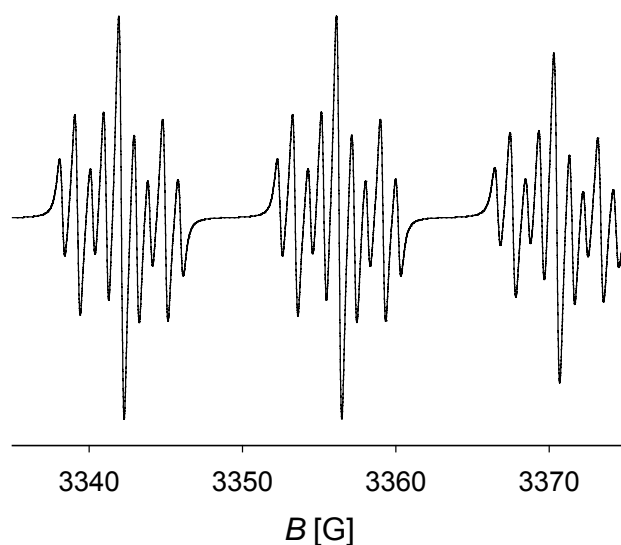


Abbildung 4-46: Simulation des ESR-Spektrums aus Abbildung 4-45.

Der Vergleich des ESR-Spektrums mit der Simulation zeigt, dass das Spin-Addukt schnell abreagiert. Obwohl ein Alkoxy-Radikal generiert wurde, weisen die Kopplungskonstanten (Tabelle 4-7) auf das *tert.*-Butyl-nitroxid-Radikal **59** hin (Vgl. Tab. 4-3, Lit.^[81]). Wahrscheinlich entsteht aus dem zunächst auftretenden, kurzlebigen Alkoxylnitroxid **57** das *tert.*-Butyl-Radikal (**58**) sowie die Nitroverbindung **36**. Das *tert.*-Butyl-Radikal (**58**) kann nun mit einem weiteren Molekül der Verbindung **45** zum Alkylnitroxid **59** reagieren.

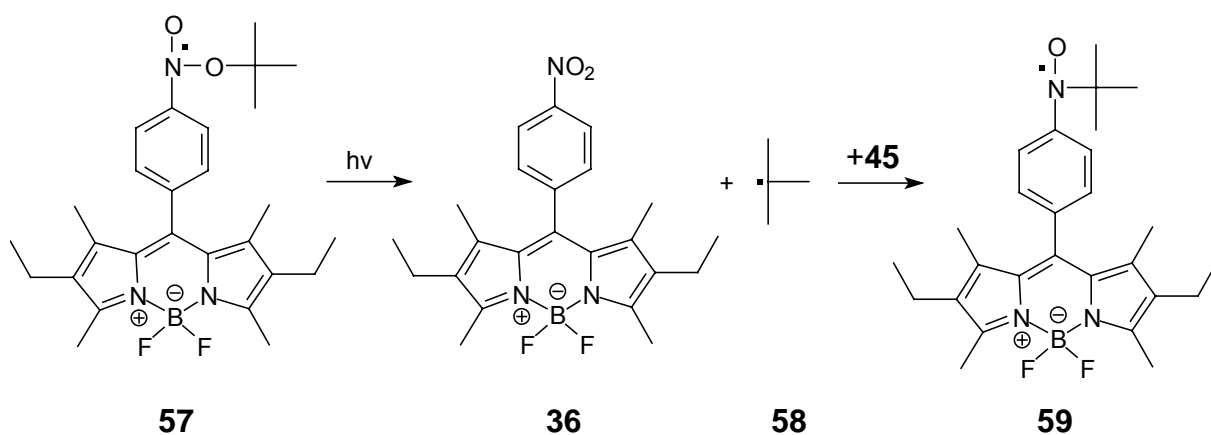


Tabelle 4-7: Ermittelte Kopplungskonstanten und g -Werte der Nitroxid-Radikale aus den Abbildungen 4-41, 4-43 und 4-45.

Radikal	$a(N)$ [G]	$a(o-H)$ [G]	$a(m-H)$ [G]	weitere H-Kopplungen	g -Wert
„Untergrund“-Radikal (≥ 2 Spezies)	10.30	2.67/2.67 (2H)	0.44/0.89 (2H)	1.80 0.17	2.00587(3)
2-Cyano-2-propyl-Radikal	11.34	2.21 (2H)	0.87 (2H)	-	2.00601(5)
<i>tert.</i> -Butyl-Radikal	14.18	2.86 (2H)	0.99 (2H)	-	2.00580(6)

Die ESR-spektroskopische Untersuchung hat bewiesen, dass die Nitroso-Verbindung **45** als Radikalfänger geeignet ist.

4.3.10.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der Verbindung **45** erfolgte in Benzol ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 551 \text{ nm}$). Als Radikalquelle wurde AIBN verwendet, welches in Anlehnung an die ESR-spektroskopischen Untersuchungen zunächst photolytisch in Isobutyronitril-Radikale gespalten wurde. Das Verhältnis **45** (10 μM)/AIBN betrug (1:10). Die zunächst rotgefärbte Lösung wurde während der Photolyse orange und fluoreszierte. Es stellte sich jedoch heraus, dass durch die Bestrahlung das Fluorophor zerstört wurde (farblose Messlösung nach 240 Sekunden). Dies zeigte sich auch bereits bei der ESR-Messung, bei der durch Bestrahlung bereits geringe Mengen Radikale gebildet wurden. Diese könnten wiederum am Fluorophor Reaktionen auslösen, die zur Zerstörung der Verbindung führen. Aus diesem Grund sollte die Radikalerzeugung thermisch erfolgen.

Die zur Fluoreszenzmessung verwendete Lösung enthielt 10 μM **45** und 100 μM AIBN in Benzol. Sie wurde auf 100 °C (Badtemperatur) insgesamt 165 Minuten erhitzt. Die Messung wurde mit und ohne Argonatmosphäre durchgeführt, wobei es keine Auswirkungen auf das Ergebnis hatte. Die hier abgebildete Fluoreszenzmessung erfolgte ohne Schutzgasatmosphäre. Abbildung 4-47 zeigt die zwischen 5 und 165 Minuten erhaltenen Fluoreszenzspektren.

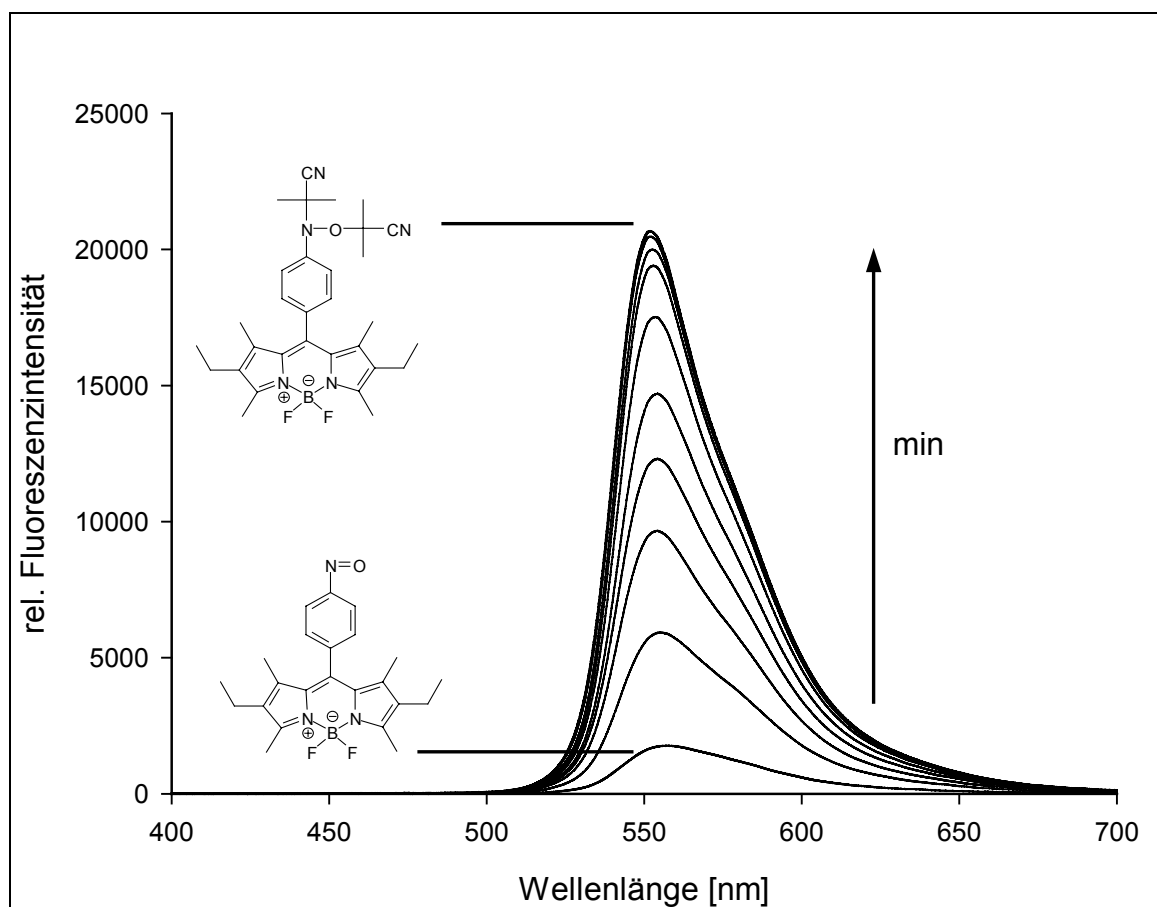


Abbildung 4-47: Fluoreszenzspektren der Nitroso-Verbindung **45** sowie von der Reaktion der Radikalsonde **45** mit Isobutyronitril-Radikalen (1:10) in Benzol (10 bis 230 min, T = 100 °C).

Das Intensitätsmaximum wurde nach 130 Minuten erreicht. Eine weitere Zugabe von AIBN nach 160 Minuten erzeugte keinen weiteren Fluoreszenzanstieg mehr, was darauf hindeutet, dass die Nitroso-Verbindung **45** vollständig umgesetzt wurde.

Zur Quantifizierung der abgefangenen Isobutyronitril-Radikale durch den Fänger **45** wurde das dabei entstehende 2-((Cyano-dimethyl-methoxy-[4-(2,6-diethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-3a,4a-di-aza-4-bora-s-indacen-8-yl)-phenyl]-amino)-2-methylpropionitril (**47**) synthetisiert.

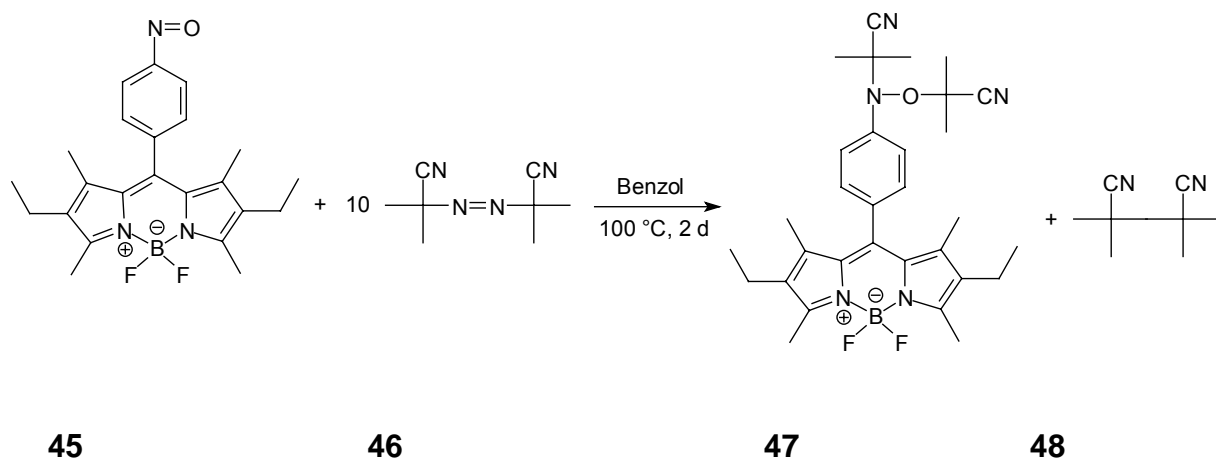


Abbildung 4-48: Darstellung des Abfangproduktes der Reaktion von Verbindung **45** mit Isobutyronitril-Radikalen zur Quantifizierung der abgefangenen Radikale.

Die bei dem Abfang von Isobutyronitril-Radikalen entstehende Verbindung **47** wurde zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden verwendet (Abbildung 4-49).

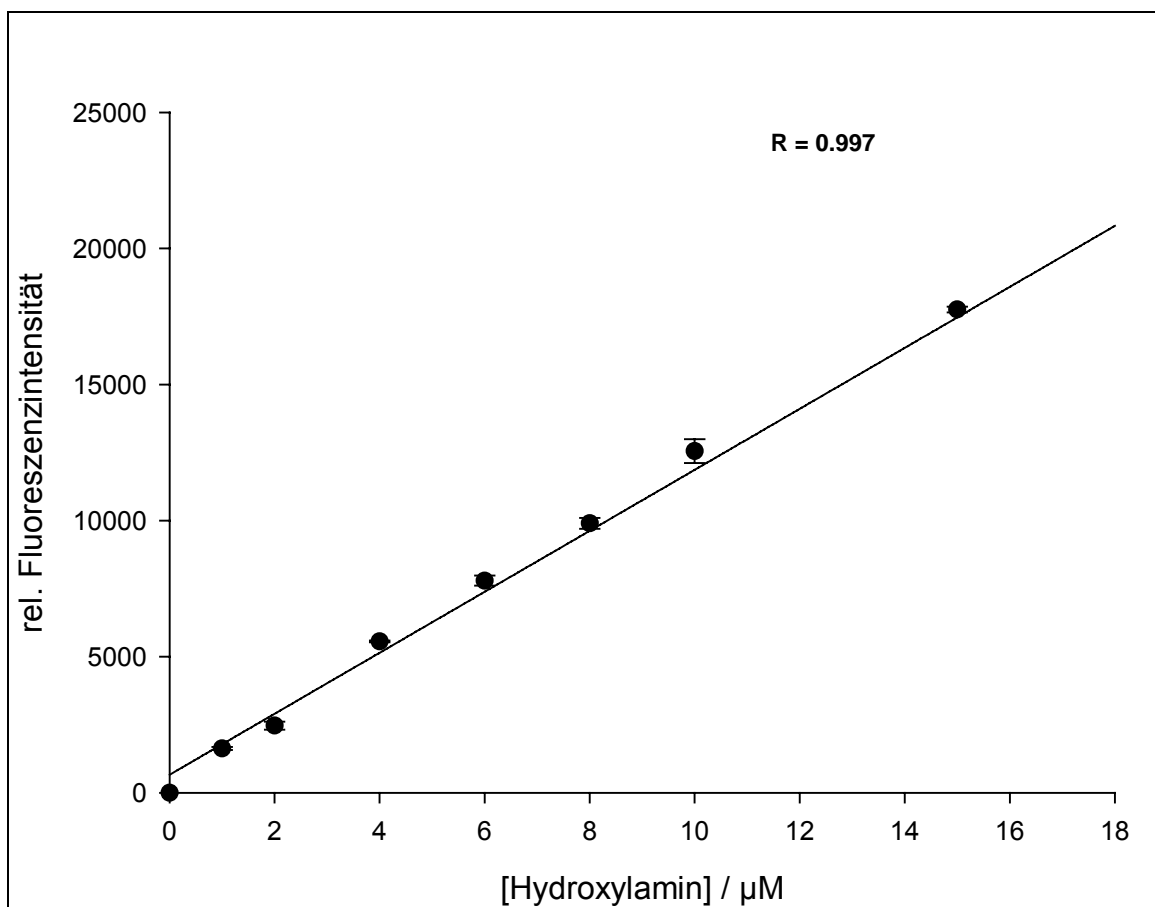


Abbildung 4-49: Kalibrierungsgerade zur Quantifizierung der abgefangenen Isobutyronitril-Radikale.

Bei der anschließenden Abfangreaktion von Isobutyronitril-Radikalen durch die Radikalsonde **45** wurde die Konzentration an AIBN variiert, während die Konzentration der Radikalsonde **45** mit 10 μM konstant gehalten wurde.

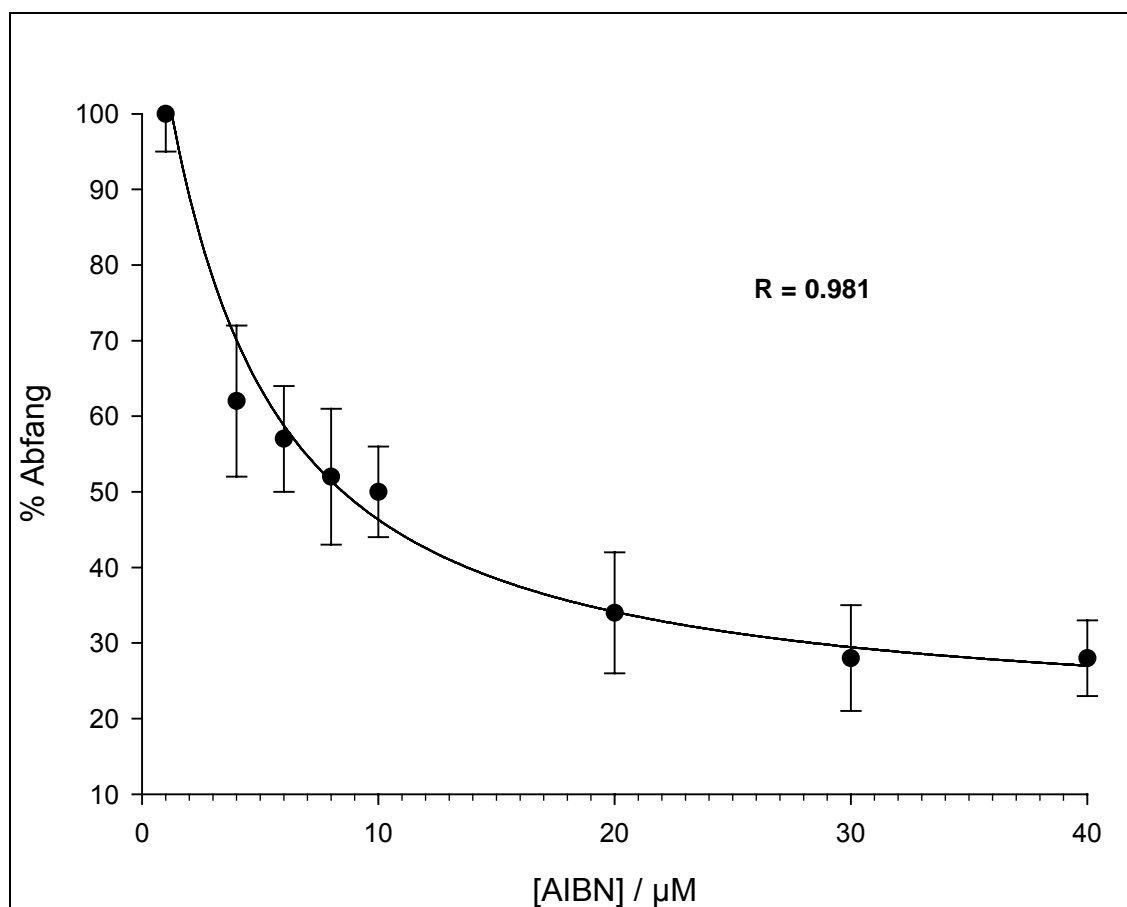


Abbildung 4-50: Prozentualer Abfang von Isobutyronitril-Radikalen durch den Fänger **45** ($[\mathbf{45}] = 10 \mu\text{M}$, $[\text{AIBN}] = 1 \mu\text{M} - 40 \mu\text{M}$).

Abbildung 4-50 zeigt, dass mit steigender AIBN-Konzentration der Abfang der Radikale durch die Sonde **45** von 100 % auf unter 30 % abnimmt. Nur bei einem 10fachen Überschuss des Fängers ist ein vollständiger Radikalabfang gewährleistet. Bereits bei einem Verhältnis von 10 μM **45**/4 μM AIBN beträgt die Effektivität des Abfanges nur noch etwa 60 %. Dies ist darauf zurückzuführen, dass mit steigender Radikal-Konzentration die statistische Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zweier Isobutyronitril-Radikale zum 2,2,3,3-Tetramethylsuccinonitril zunimmt.

4.3.10.3 Untersuchung der Reduktionsempfindlichkeit

Die Reduktionsempfindlichkeit der potentiellen Radikalsonde **45** wurde im zellfreien System durch Zugabe verschiedener, in der Zelle auftretender Reduktionsmittel untersucht. Dabei wurden 10 μM des Nitrons **45** mit unterschiedlichen Konzentrationen von 2-100 μM des jeweiligen Reduktionsmittels (Ascorbinsäure, NADH, Glutathion und Glucose) versetzt. In den Abbildungen 4-51 bis 4-54 sind die kontinuierlichen Fluoreszenzmessungen dargestellt. Die genaue Durchführung der Messungen ist in Abschnitt 7.7.3 (Experimenteller Teil) beschrieben.

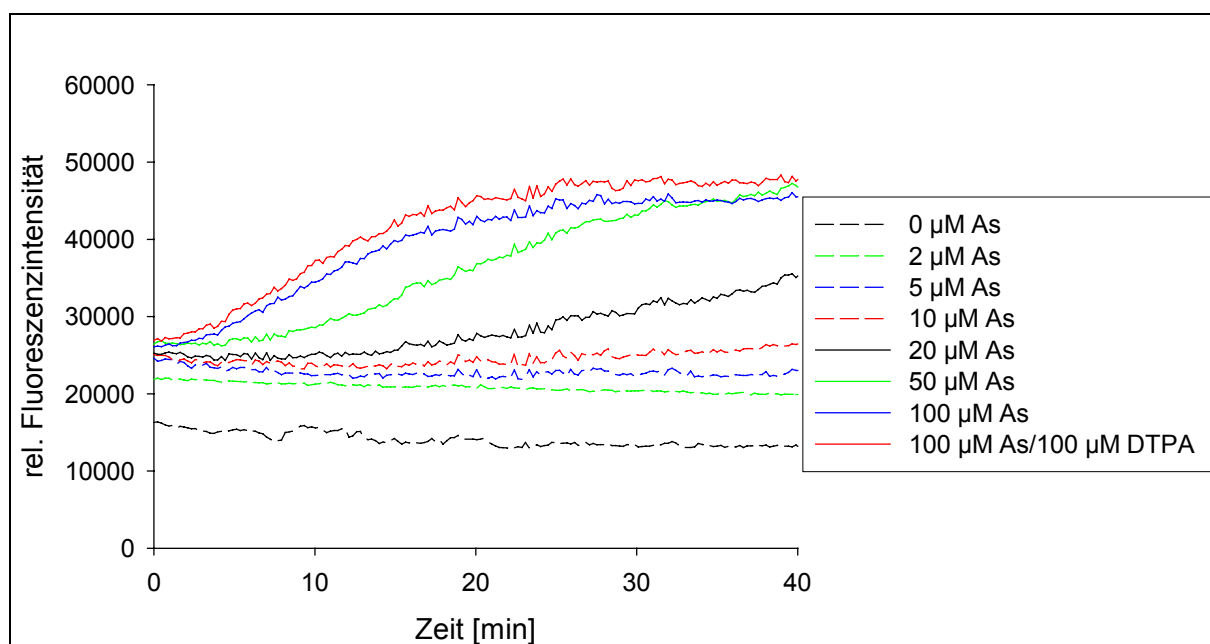


Abbildung 4-51: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung der Reaktion des Nitrons **45** (10 μM) mit Ascorbinsäure (As) (2-100 μM).

Abbildung 4-51 zeigt, dass geringe Mengen an Ascorbinsäure (2-5 μM) im Gegensatz zum untersuchten Nitron **41** nicht ausreichen, um die gering fluoreszierende Nitroso-Verbindung **45** zum fluoreszierenden Hydroxylamin zu reduzieren. Bei höheren Ascorbinsäure-Konzentrationen wird aber auch die Verbindung **45** reduziert. Die Zugabe von DTPA als Eisen(II)-Chelator sollte sicherstellen, dass die Zunahme der Fluoreszenz nicht durch Radikalabfang (Eisen-induzierte Radikalbildung) verursacht wurde.

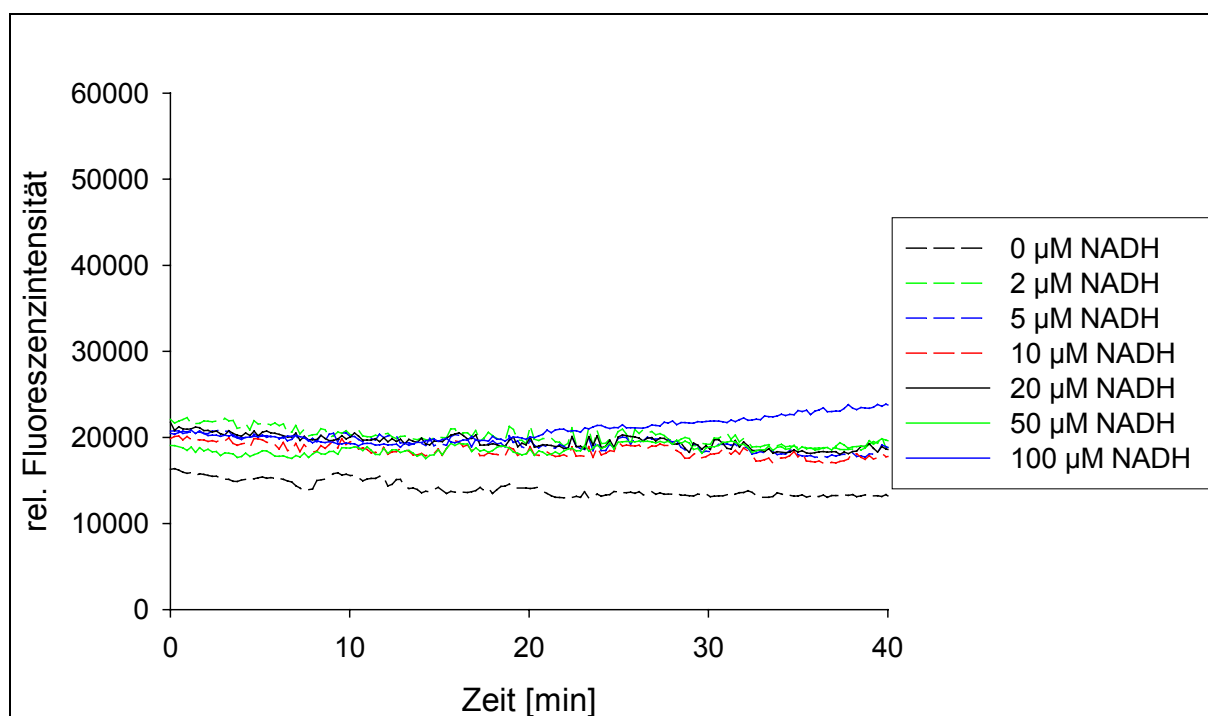


Abbildung 4-52: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung der Reaktion der Nitroverbindung **45** (10 µM) mit NADH (2-100 µM).

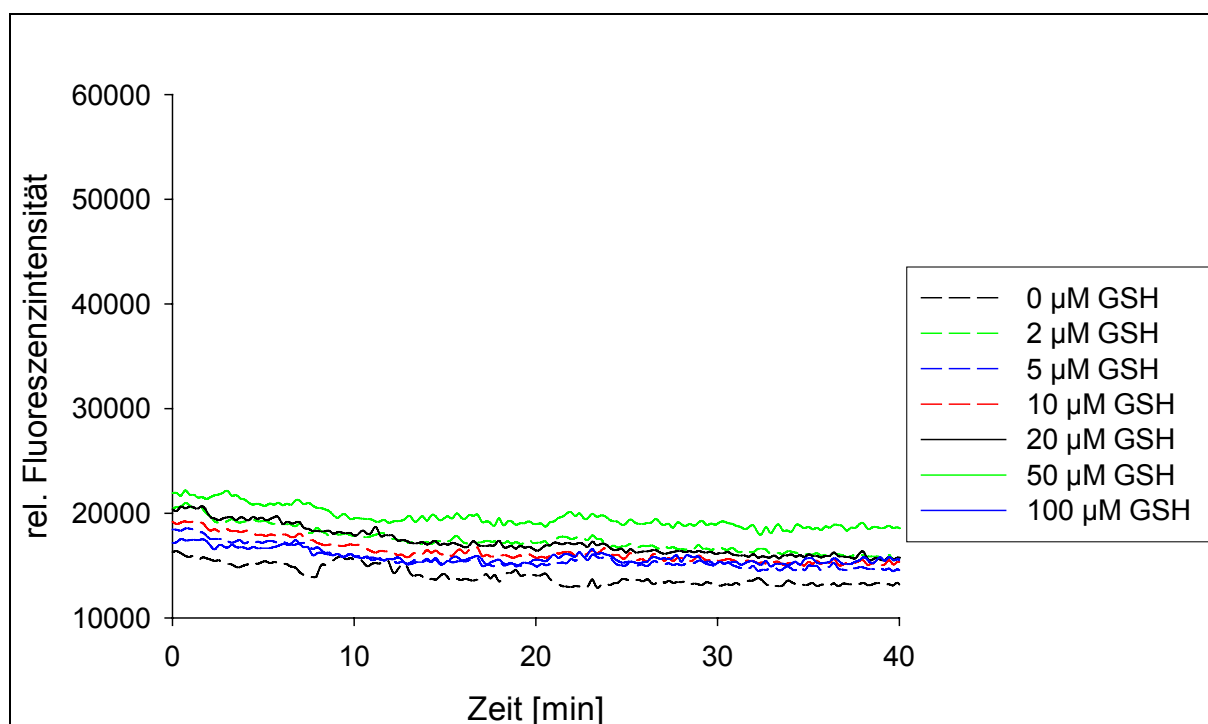


Abbildung 4-53: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung der Reaktion der Nitroverbindung **45** (10 µM) mit Glutathion (GT) (2-100 µM).

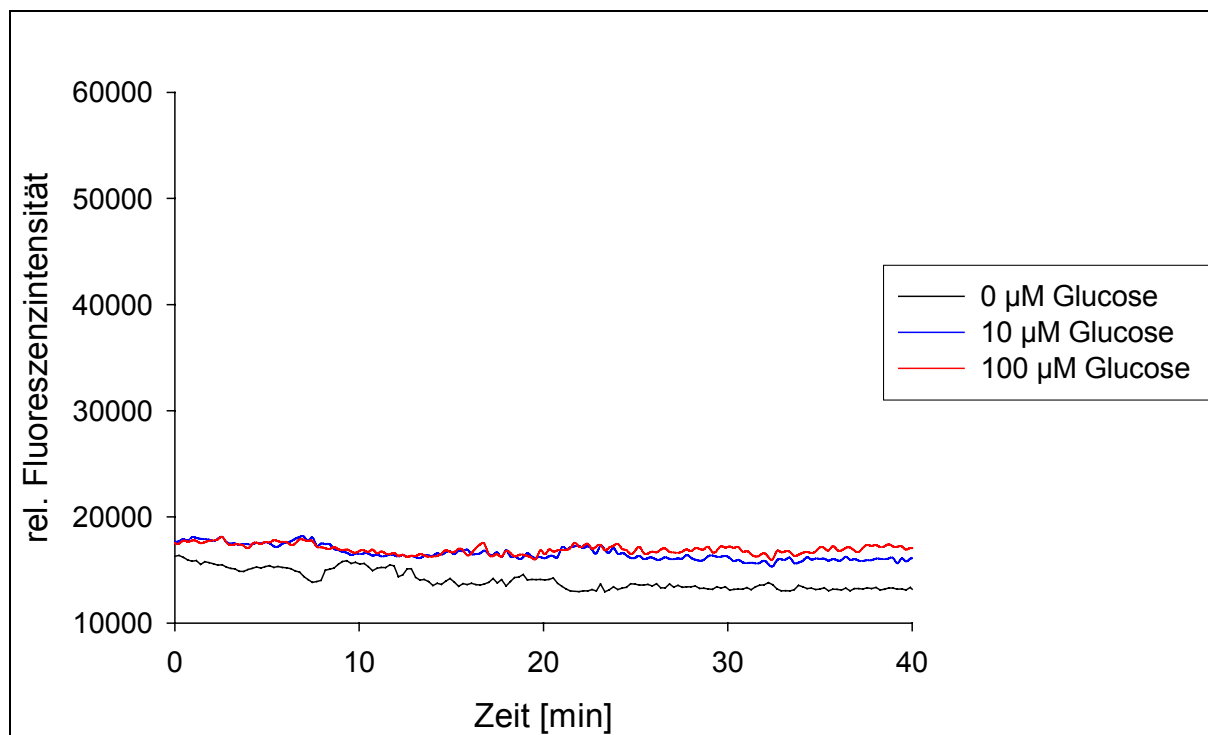


Abbildung 4-54: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung der Reaktion der Nitrosoverbindung **45** (10 µM) mit D-Glucose (2-100 µM).

In den Abbildungen 4-52 bis 4-54 ist zu sehen, dass die Nitroso-Verbindung **45** von den Reduktionsmitteln NADH, Glutathion und Glucose in den relevanten Konzentrationen nicht reduziert wird. Dagegen tritt eine Reduktion zum fluoreszierenden Hydroxylamin durch Ascorbinsäure ab einem Verhältnis **45**/Ascorbinsäure im Bereich von 1:1 bis 1:2 auf.

Insgesamt zeigt die Nitroso-Verbindung **45** im Vergleich zum Nitron **41** eine deutlich geringere Reduktionsempfindlichkeit. Die Ascorbat-Konzentration in Hepatozyten liegt bei etwa 5 mM, in Fibroblasten geht sie sogar gegen 0.^[82] Da die intrazelluläre Indikatorkonzentration aufgrund des Akkumulationsverhaltens gewöhnlich die angewandte Beladungskonzentration um ein Vielfaches übertrifft,^[64] könnte eine zelluläre Indikatorkonzentration erreicht werden, die über der Ascorbat-Konzentration liegt. Damit besteht die Möglichkeit, dass eine zelluläre Radikal-Detektion trotz vorhandenem Ascorbat erfolgen könnte, wodurch eine Untersuchung der potentiellen Radikalsonde **45** im zellulären System sinnvoll ist.

4.4 Einsatz der Fluoreszenzsonden im zellulären System

Die Versuche im chemischen System haben gezeigt, dass der Einsatz von gering fluoreszierenden Radikalfängern, welche nach Radikalabfang Produkte mit hohen Fluoreszenzquantenausbeuten bilden, zum Erfolg führen. Allerdings könnte die nachgewiesene Reduktionsempfindlichkeit der Nitrosoverbindung **45** gegenüber Ascorbinsäure ($\text{45/Ascorbinsäure} < 1$) zu Problemen bei der Anwendung im zellulären System führen. Die Konzentration von Ascorbat in der Zelle ist je nach Zelltyp unterschiedlich. Bei den Hepatozyten beträgt sie etwa 5 mM,^[82] sodass bei einer zellulären Konzentration von ≥ 5 mM **45** eine Bestimmung von Radikalen ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse durch Reduktion möglich sein könnte. Zudem sollte die zelluläre Konzentration der potentiellen Radikalsonde **45** möglichst groß sein, um einen vollständigen Radikalabfang zu gewährleisten (Vgl. Abbildung 4-48). Aus diesem Grund sollte zunächst die zelluläre Konzentration der Verbindung **45** bestimmt werden. Ebenfalls sollte eine Untersuchung hinsichtlich einer möglichen Toxizität der Nitrosoverbindung **45** sowie die Lokalisation des Farbstoffes mittels Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgen. Schließlich sollte überprüft werden, ob das im chemischen System funktionierende Prinzip der Radikal-Detektion mit der Sonde **45** (Fluoreszenzintensitätsanstieg nach Radikalabfang) auch in vitalen Zellen anwendbar ist. Alle Zellversuche wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die hier dargestellten Messergebnisse entsprechen den Mittelwerten von 6fach-Bestimmungen, welche an drei verschiedenen Messtagen und damit für drei verschiedene Zellpräparationen (drei unterschiedliche Tiere) durchgeführt wurden. Abweichungen wurden an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

4.4.1 ERMITTLUNG DER ZELLULÄREN INDIKATOR-KONZENTRATION

Die Untersuchungen zur Ermittlung der zellulären Indikator-Konzentration wurden mit Ratten-Hepatozyten durchgeführt. Die Zellen wurden drei Stunden bei 37 °C (5.00 % CO₂ / 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %) in KH-Puffer mit 10 µM bzw. 50 µM Indikator **45** inkubiert und anschließend die Konzentrationen im Zellüberstand und im Zelllysats UV/Vis-spektroskopisch bestimmt. Abbildung 4-55 zeigt die graphische Darstellung der UV/Vis-Spektren des Zellüberstandes, des Zelllysats und

der zellfreien Messung der Sonde **45** (zur Ermittlung von $\log \varepsilon$) am Beispiel der Konzentration 10 μM . Alle Messungen fanden in wässriger Pufferlösung (Krebs-Henseleit, KH) bei pH 7.35 mit einem Anteil von 0.2 % Pluronic und 1 % DMSO statt.

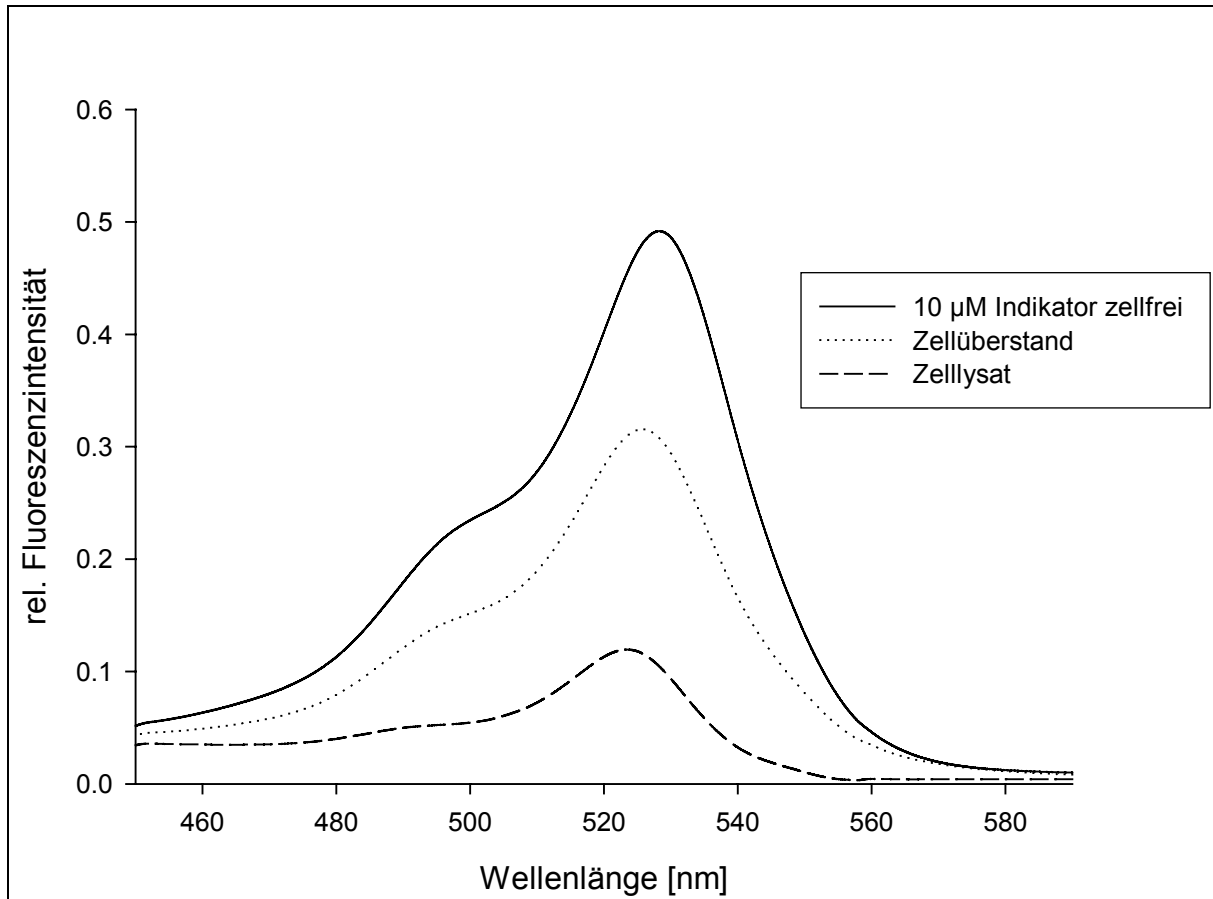


Abbildung 4-55: Ermittlung der zellulären Konzentration der Fluoreszenzsonde **45** in Ratten-Hepatozyten (Primärkultur).

Im Zelllysat finden sich etwa 25 % des Indikators **45** ($\log \varepsilon = 4.57$ bei $\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$) aus der Inkubationslösung wieder. Im Überstand konnten die restlichen 75 % der Verbindung **45** lokalisiert werden. Bei einer Beladungskonzentration von 10 μM **45** ergab sich eine zelluläre Konzentration von $0.91 \pm 0.09 \text{ mM}$ **45**, bei Beladung mit 50 μM betrug die zelluläre Konzentration $4.29 \pm 0.58 \text{ mM}$ **45**. Bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellen wurde allerdings bei der Beladungskonzentration von 50 μM festgestellt, dass Anteile des Farbstoffes in der Zelle auskristallisieren. Daher kann die exakte Konzentration an gelöstem Stoff **45** bei 50 μM Beladung nicht angegeben werden.

4.4.2 VITALITÄTSBESTIMMUNG

In Folge einer Schädigung der Plasmamembranen können cytosolische Proteine in den Extrazellulärraum gelangen, d.h. bei Zellkulturen in die Inkubationslösung. Enzyme, welche im Cytosol in hoher Aktivität vorkommen, lassen sich besonders einfach nachweisen. In Zellkulturen wird als enzymatischer Parameter der Zellschädigung zumeist die Freisetzung der cytosolischen Lactat-Dehydrogenase (LDH) verwendet. Der Toxizitätsgrad des Farbstoffes **45** wurde bestimmt, indem die Freisetzung des Enzyms Lactose-Dehydrogenase (LDH) im Zellüberstand gemessen wurde. Bei den Untersuchungen wurden Ratten-Hepatozyten (Primärkultur) verwendet, welche über fünf Stunden mit dem Farbstoff **45** in unterschiedlichen Konzentrationen beladen wurden. Alle Versuche fanden in wässriger Pufferlösung (KH, pH 7.35) statt. Es wurden drei verschiedene Ansätze verfolgt:

- ohne Zusätze zur Ermittlung der Toxizität von Verbindung **45**,
- mit L-Histidin-Zusatz zur Ermittlung einer eventuellen Protektivität von Verbindung **45**,
- mit Fe(III)/8-Hydroxychinolin (Fe/8-HQ) zur Ermittlung einer eventuellen Protektivität von Verbindung **45**.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Abbildungen 4-56 bis 4-58 dargestellt.

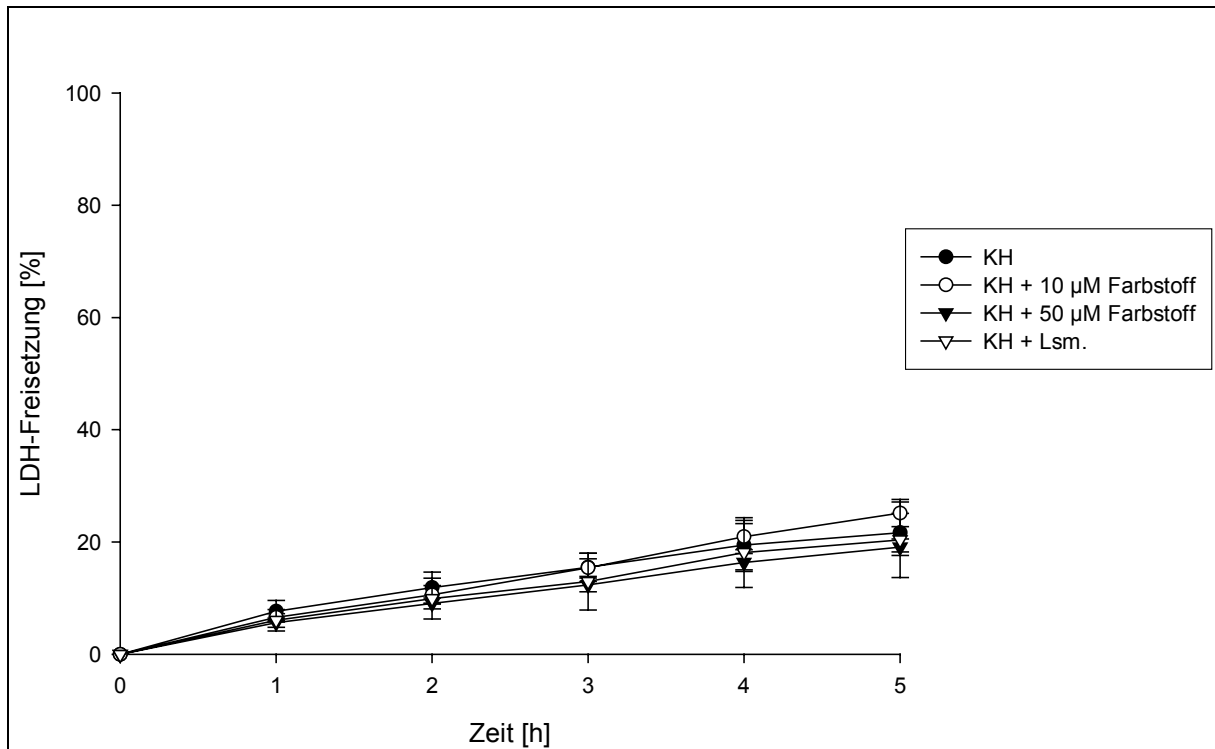


Abbildung 4-56: Vitalitätsbestimmung durch Messung der freigesetzten LDH-Menge (Primärkultur Ratten-Hepatozyten).

In Abbildung 4-56 ist die LDH-Freisetzung der Zellen über fünf Stunden graphisch dargestellt (37 °C, 5.00 % CO₂/95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %). Die Zellen wurden mit dem Farbstoff **45** (Beladungskonzentration 10 bzw. 50 µM) sowie ausschließlich mit den verwendeten Lösungsmitteln (1 % DMSO, 0.2 % Pluronic) beladen. Als Vergleich dienen die Ergebnisse der nur mit KH-Puffer behandelten Zellen. Bei einer LDH-Freisetzung unter 30 % gilt ein Stoff als nicht toxisch. Somit sind die hier eingesetzten Konzentrationen 10 µM und 50 µM des Farbstoffes **45** über einen Zeitraum von fünf Stunden als nicht toxisch anzusehen.

In Abbildung 4-57 ist die LDH-Freisetzung über fünf Stunden (37 °C, 5.00 % CO₂/95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %) bei Schädigung der Zellen mit L-Histidin dargestellt. Hierbei handelt es sich um das Modell der stärksten Lipidperoxidation, einer Eisen-abhängigen Schädigung durch His-Fe-Komplexe (durch Zusatz von Eisen-Chelatoren erfolgt eine Inhibierung der Schädigung). Der mit 198 mM L-Histidin versetzte KH-Puffer wurde bei allen fünf Versuchen (nur

Puffer, Puffer mit 2/10/50 μM Farbstoff **45**, Puffer mit den Lösungsmitteln DMSO (1 %) / Pluronic (0.2 %) verwendet.

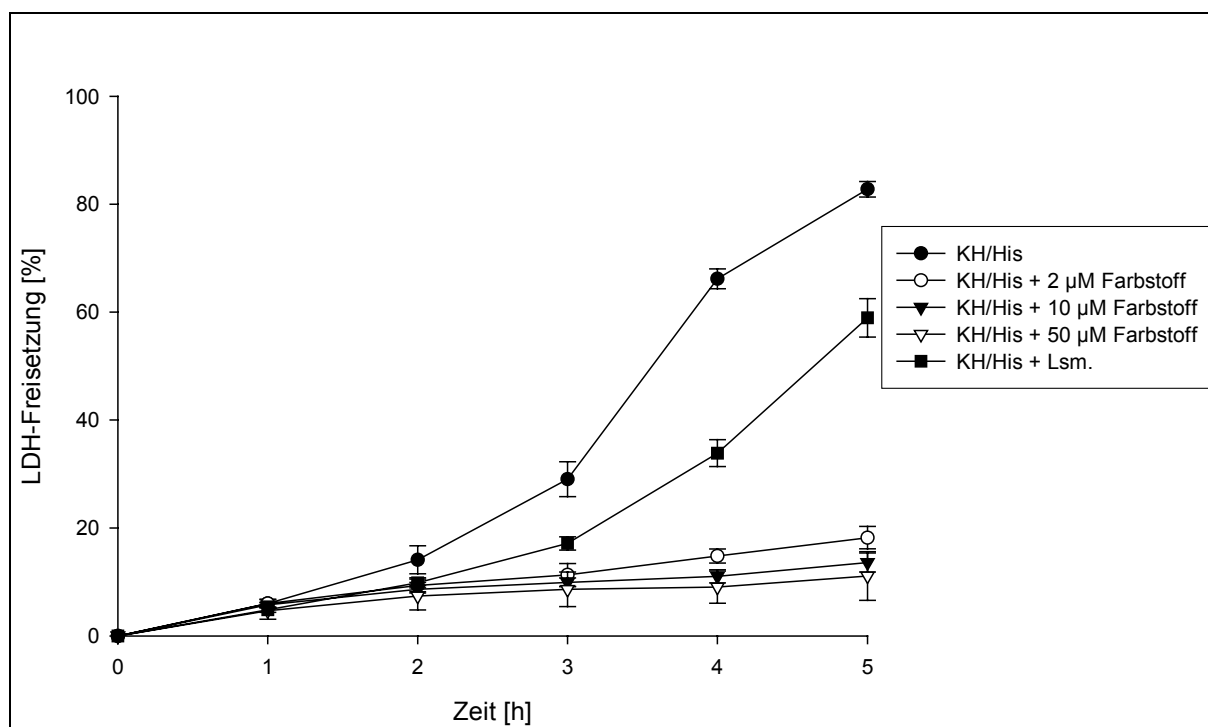


Abbildung 4-57: Vitalitätsbestimmung durch Messung der freigesetzten LDH-Menge (Primärkultur Ratten-Hepatozyten, Schädigung durch L-Histidin).

Hierbei wird die Protektivität der Verbindung **45** deutlich. Während ohne Zusatz des Farbstoffes nach fünf Stunden bereits bei mehr als der Hälfte der Zellen der Zelltod eingetreten ist, liegt die LDH-Freisetzung bei Zusatz des Farbstoffes **45** in allen drei Konzentrationen (2, 10, 50 μM) nach fünf Stunden noch unter 20 %. Die Protektivität nimmt hier mit der Farbstoffkonzentration leicht zu.

In Abbildung 4-58 wurde den Systemen mit KH-Puffer, KH-Puffer mit Farbstoff (2, 10, 50 μM) sowie KH-Puffer mit Lösungsmitteln (DMSO (1 %), Pluronic (0.2 %)) jeweils 15 μM Fe(III)/ 30 μM 8-Hydroxychinolin (HQ) zugesetzt. Bei diesem Schädigungs-Modell wird die Konzentration an Fe(II) in der Zelle durch Zugabe des membranpermeablen Fe(III)-8-HQ-Komplexes erhöht und damit die OH-Radikal-Produktion (Fenton-Reaktion) gesteigert (Untersuchungen von Lehnen-Beyel et al. bestätigten eine schnelle intrazelluläre Reduktion der Fe^{3+} -Ionen zu Fe^{2+} -Ionen)^[83].

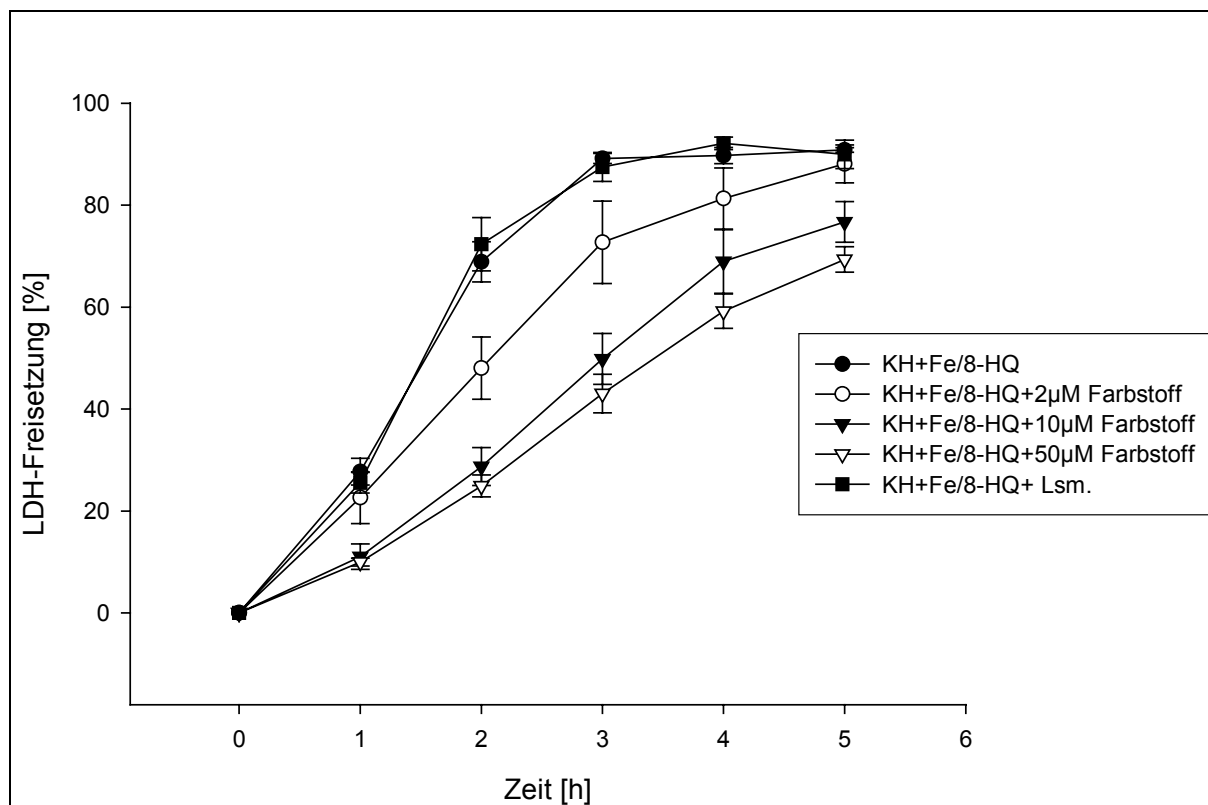


Abbildung 4-58: Vitalitätsbestimmung durch Messung der freigesetzten LDH-Menge (Primärkultur Ratten-Hepatozyten, Schädigung durch Fe(III)/8-Hydroxychinolin (HQ)).

Bei diesem Modell zeigt sich ebenfalls eine Protektivität des Farbstoffes **45**, welche jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie bei dem Histidin-Modell (Abbildung 4-57). Dies lässt vermuten, dass der Abfang C-zentrierter Radikale (Lipidperoxidation) deutlich effektiver erfolgt als der Abfang O-zentrierter Radikale. Allerdings könnte auch die intrazelluläre Verteilung des Indikators **45** Ursache für die unterschiedlich stark ausgeprägte Protektivität bei dem Histidin-Modell und dem Fe(III)/8-HQ-Modell sein.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass der Farbstoff **45** keine Toxizität aufweist und bei Erzeugung von Radikalen durch Zugabe von L-Histidin und Erhöhung der zellulären Fe(II)-Konzentration protektiv wirkt. Eine Beladungskonzentration von 10 µM **45** erscheint dabei ausreichend, da die Protektivität im Vergleich zur Beladung mit 50 µM annähernd identisch ist.

4.4.3 SUBZELLULÄRE VERTEILUNG DES FARBSTOFFES

Zur Lokalisation des Farbstoffes **45** in der Zelle wurden Ratten-Hepatozyten (Primärkultur) mit 10 μM der Verbindung **45** (1 % DMSO, 0.2 % Pluronic) zwei Stunden bei 37 °C beladen (KH-Puffer). Abbildung 4-59 zeigt die zelluläre Verteilung des aus dem Farbstoff **45** entstehenden, fluoreszierenden Radikalabfang- bzw. Reduktionsproduktes.

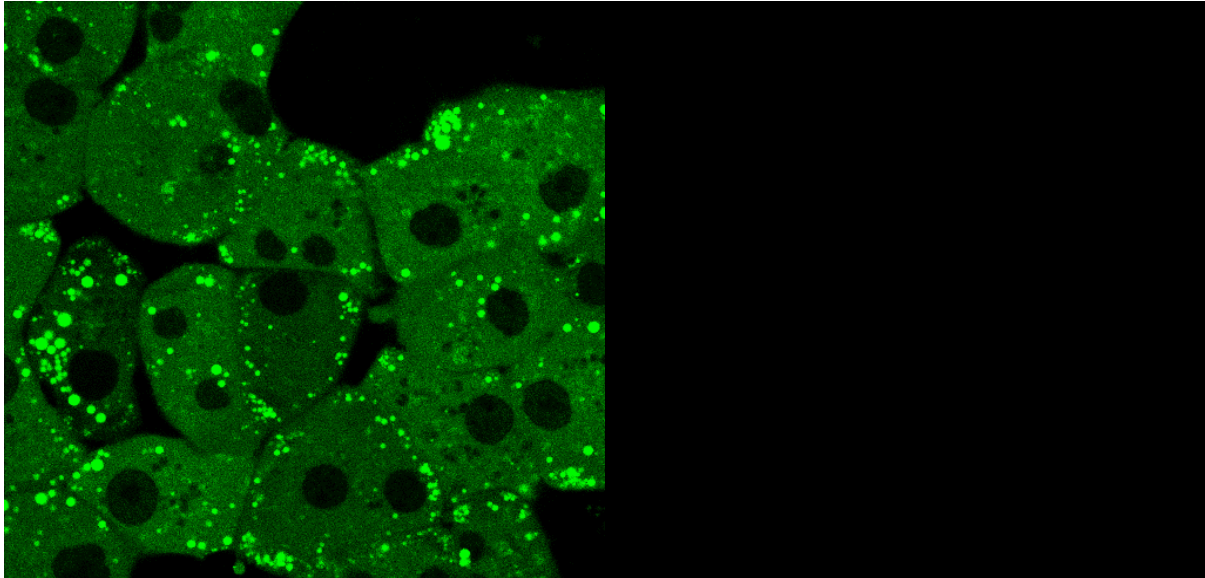


Abbildung 4-59: (A) Intrazelluläre Lokalisation des aus dem Farbstoff **45** entstehenden Radikalabfang- bzw. Reduktionsproduktes in kultivierten Rattenhepatozyten. Die Aufnahme mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) erfolgte nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten bei einer Beladungskonzentration von 10 μM **45**. (B) LSM-Aufnahme von kultivierten Rattenhepatozyten nach gleicher Behandlung wie (A), ohne Farbstoff (Leerwert) (KH, 37 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$).

In Abbildung 4-59 ist vor allem die Akkumulation der Nitrosoverbindung **45** in den Lipidtröpfchen als hellgrüne Punkte zu erkennen (Lipidtröpfchen = Einlagerung von Fettsäuren; entstehen, wenn Hepatozyten z.B. stressbedingt nicht mehr in der Lage sind, die aufgenommenen Fettsäuren wieder abzugeben). Daneben ist eine diffuse Fluoreszenz sichtbar, die aus einer relativ gleichmäßigen Verteilung des Farbstoffes **45** in der Zelle – unter Aussparung des Zellkerns und einiger vesikulärer Strukturen, wahrscheinlich Lysosomen – resultiert. Vermutlich ist der Farbstoff **45** im Cytosol und möglicherweise auch in den Mitochondrien an Proteine gebunden und zum Teil auch

in die Membranen (Endoplasmatisches Reticulum, Mitochondrien) eingelagert, da ansonsten keine so gleichmäßig hohe Fluoreszenz über die ganze Zelle erhalten werden würde. Der Farbstoff **45** scheint in den Membranen nicht in einer sehr viel höheren Konzentration als im Cytosol vorzuliegen. Die zelluläre Verteilung der Sonde **45** und die Untersuchungsergebnisse der Vitalitätsbestimmung (Abschnitt 4.4.2) legen die Vermutung nahe, dass die hohe Protektivität der Verbindung **45** bei Schädigung der Zellen mit L-Histidin (Modell der stärksten Lipidperoxidation) durch die Akkumulation des Farbstoffes **45** in den Membranen, also am Ort der Schädigung, begründet ist.

Bei einer Schädigung durch Zugabe von Fe(III)/8-HQ ist neben der Lipidperoxidation auch mit der Bildung von Radikalen im Cytosol und in den Zellorganellen zu rechnen. Da es sich bei der Verbindung **45** um einen stark lipophilen Stoff handelt, ist dieser im Cytosol vermutlich an Proteine gebunden und daher eventuell für Radikale schlechter zugänglich. Dies könnte die weniger stark ausgeprägte Protektivität bei der Schädigung durch Erhöhung der Fe(II)-Konzentration erklären.

4.4.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR EIGNUNG ALS RADIKALSONDE IM ZELLULÄREN SYSTEM

Die in Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass für die weiteren Untersuchungen hinsichtlich des Einsatzes der Verbindung **45** als Radikalsonde im zellulären System eine Konzentration von 10 μM **45** ausreichend sein sollte. Bei höherer Beladungskonzentration besteht die Gefahr, dass der Farbstoff in der Zelle auskristallisiert. Die Versuche zur Vitalitätsbestimmung zeigten, dass eine Erhöhung der Beladungskonzentration von 10 μM auf 50 μM nur eine unwesentliche Steigerung der Protektivität nach sich zieht. Bei einigen Versuchen wurden teilweise dennoch niedrigere und höhere Beladungskonzentrationen gewählt, um die erhaltenen Ergebnisse bei einer Konzentration von 10 μM **45** abzusichern. Der Farbstoff wurde jeweils mit der für die Zellen maximal vertretbaren Menge von 1 % DMSO und 0.2 % Pluronic in die Zellen eingebracht.

4.4.4.1 Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch L-Histidin

Für die Untersuchungen zur Schädigung durch L-Histidin wurden Rattenhepatozyten (Primärkultur) mit 2, 10 und 50 μM des Farbstoffes **45** beladen. Der verwendete KH-Puffer enthielt dabei zum einen 198 mM L-Histidin und zum anderen ausschließlich KH-Puffer. Daneben wurde eine Lösungsmittelkontrolle angesetzt, in der die Zellen mit KH-Puffer (198 mM L-Histidin) und den verwendeten Lösungsmitteln DMSO / Pluronic beladen wurden. Zur Kontrolle erfolgten Messungen ohne Zellen analog der durchgeführten Zellmessungen. Diese stellten sicher, dass der Fluoreszenzanstieg nicht bereits durch den Puffer, das L-Histidin etc. verursacht wurde (nicht abgebildet). Alle Messungen erfolgten sofort nach Zugabe des Farbstoffes **45** (Abbildungen 4-60 bis 4-62).

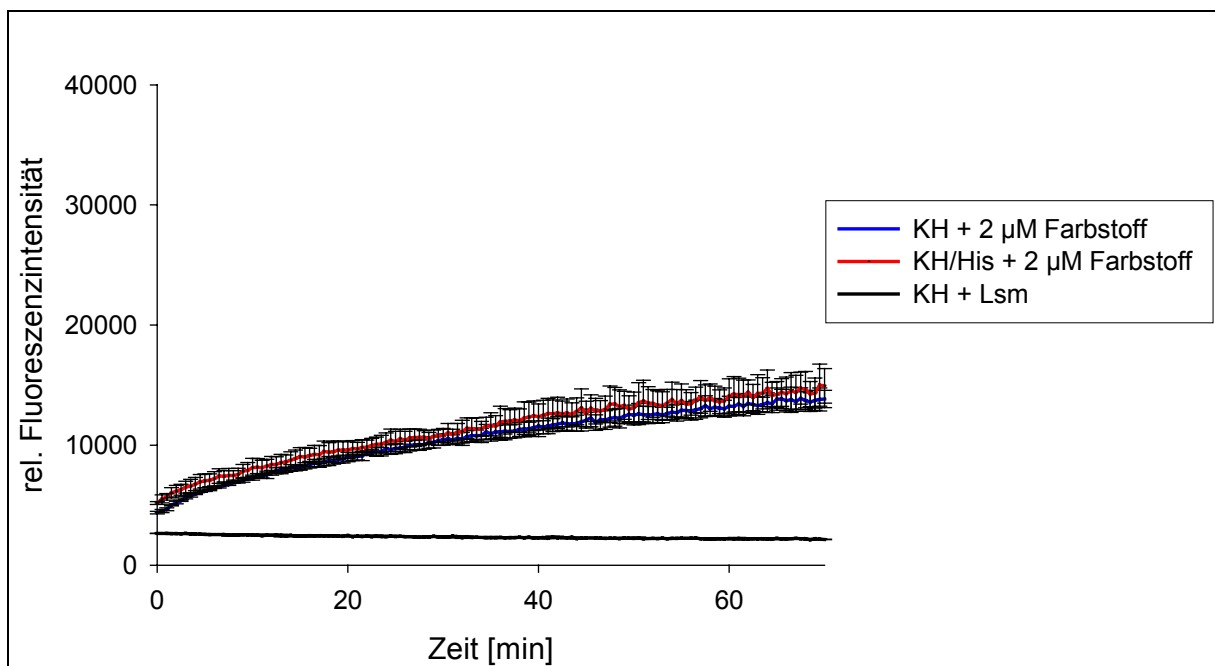


Abbildung 4-60: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2000): Schädigung von Rattenhepatozyten durch L-Histidin; Beladung mit 2 μM BDPNO **45**.

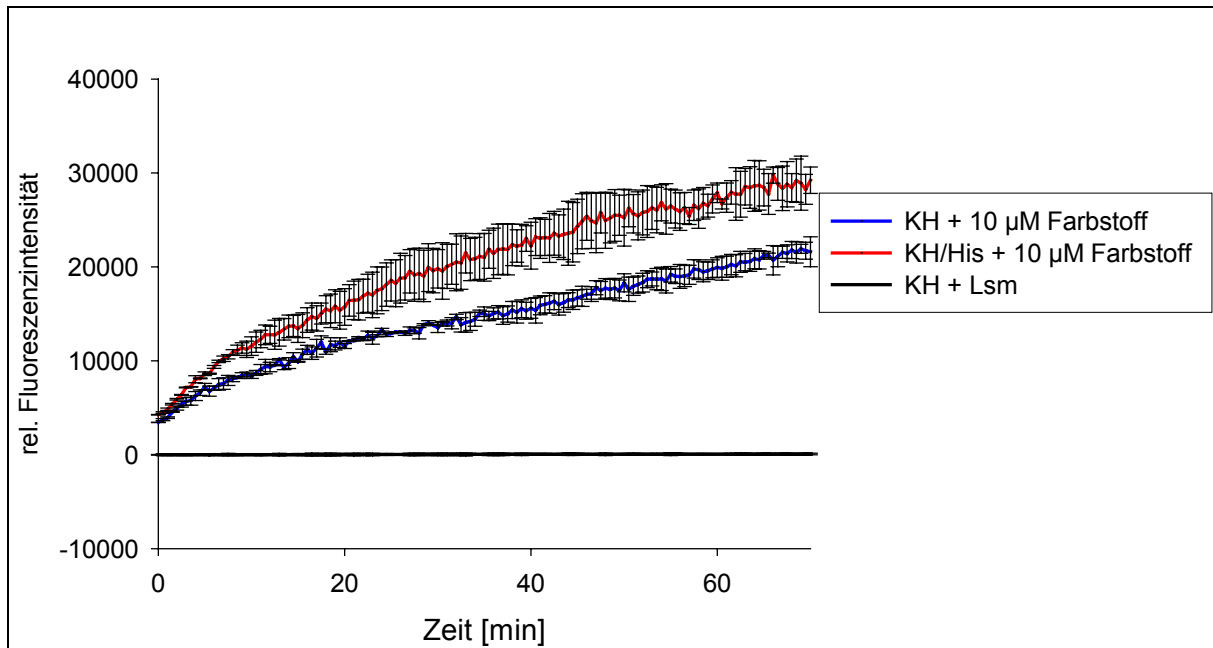


Abbildung 4-61: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2000): Schädigung von Rattenhepatozyten durch L-Histidin; Beladung mit 10 µM BDPNO **45**.

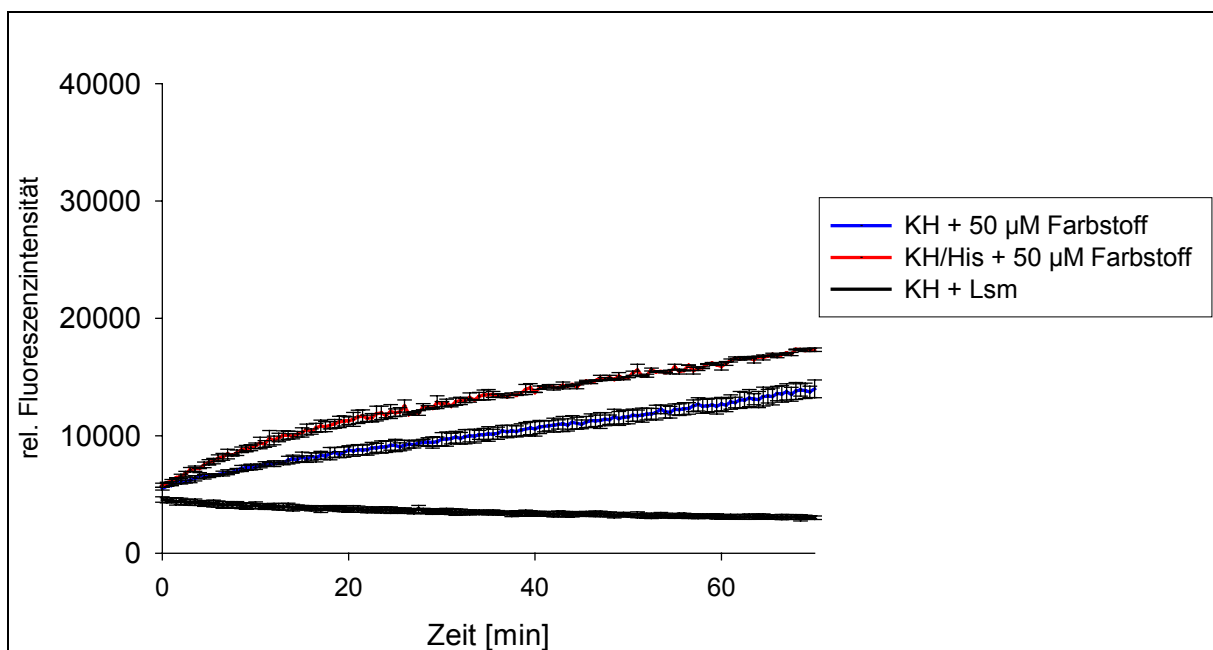


Abbildung 4-62: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2000): Schädigung von Rattenhepatozyten durch L-Histidin; Beladung mit 50 µM BDPNO **45**.

In den Abbildungen 4-60 bis 4-62 wird deutlich, dass bereits ohne Schädigung durch L-Histidin ein starker Fluoreszenzanstieg der Sonde **45** auftritt. Obwohl Hepatozyten dafür bekannt sind, dass sie aufgrund ihrer hohen Zahl von Mitochondrien vermehrt Radikale erzeugen (Fehlübertragungen von Elektronen in der Atmungskette), ist dieser Anstieg wahrscheinlich größtenteils auf eine Reduktion der Verbindung **45** zurückzuführen. Diese scheint die Detektion der Radikale durch die Sonde **45** nahezu zu überlagern. Ein leichter Anstieg im Vergleich zu den nicht mit L-Histidin geschädigten Zellen zeigt sich am deutlichsten bei einer Beladungskonzentration von 10 μM **45**. Dieser Unterschied zeigt eine mögliche Detektion von Radikalen an. Bei allen Untersuchungen der Sonde **45** im zellulären System wurde kein Fluoreszenzintensitäts-Maximum erreicht, d.h. dass der Indikator **45** zum Teil noch unverändert vorliegen muss. Die insbesondere bei der Lipidperoxidation aufgetretene hohe Protektivität der Verbindung **45** lässt vermuten, dass die in den Membranen lokalisierten Anteile der Sonde **45** weitestgehend vor einer Reduktion geschützt sind, während eventuell vorwiegend die Anteile im Cytosol reduziert werden.

4.4.4.2 Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch L-Histidin und Schutz durch Vorinkubation mit Desferal

Die Schädigung durch L-Histidin sollte wiederum zu einer erhöhten Fluoreszenz im Vergleich zu den mit Verbindung **45** beladenen, nicht geschädigten Zellen führen. Dagegen sollte die Schädigung durch L-Histidin von Zellen, welche zuvor eine halbe Stunde mit Desferal vorinkubiert wurden, weniger stark sein. Desferal dient als Eisen(II)chelator und unterbindet somit die Eisen-abhängige Bildung von Radikalen. Die mit Desferal vorinkubierten und mit dem Farbstoff **45** beladenen Zellen sollten demnach eine schwächere Fluoreszenzintensität zeigen, da weniger Radikale gebildet werden. Für die Untersuchungen wurden Rattenhepatozyten (Primärkultur) mit 10 und 50 μM des Farbstoffes **45** beladen. Der zur Schädigung der Zellen verwendete KH-Puffer enthielt 198 mM L-Histidin. Alle Messungen erfolgten sofort nach Zugabe der Verbindung **45** (Abbildungen 4-63 und 4-64).

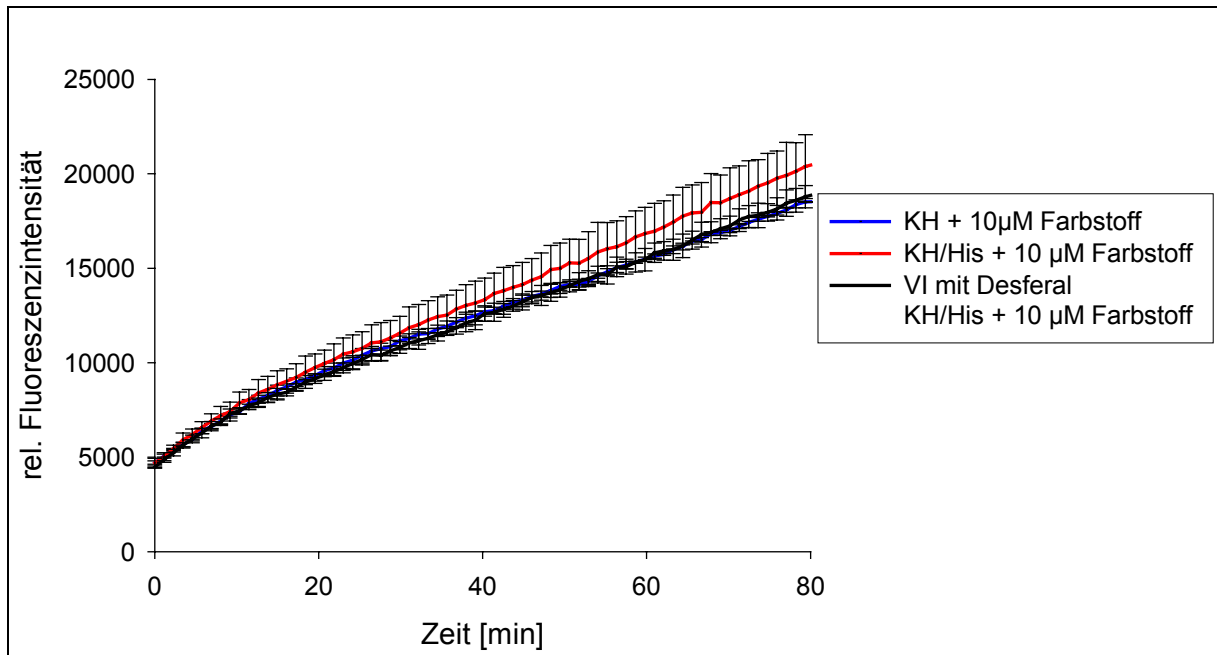


Abbildung 4-63: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2000): Schädigung von Rattenhepatozyten durch L-Histidin mit und ohne Vorinkubation mit Desferal; Beladung mit 10 µM BDPNO **45**.

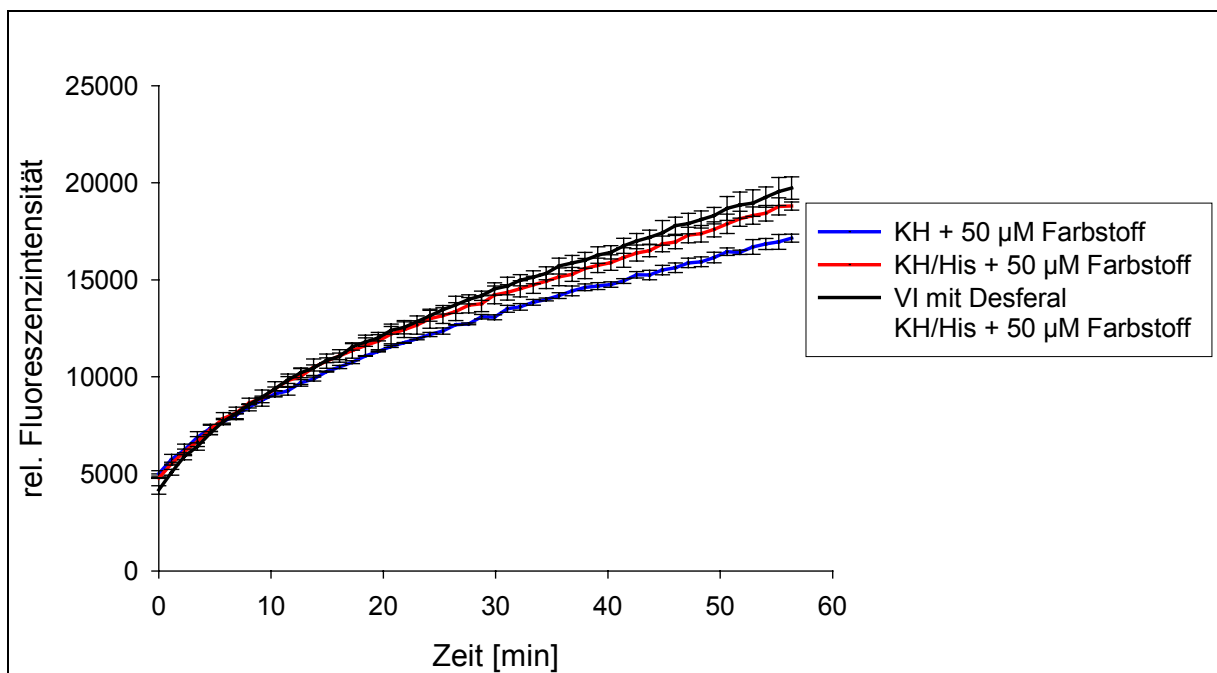


Abbildung 4-64: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2000): Schädigung von Rattenhepatozyten durch L-Histidin mit und ohne Vorinkubation mit Desferal; Beladung mit 50 µM BDPNO **45**.

Die abgebildeten kontinuierlichen Fluoreszenzspektren (Abbildungen 4-63, 4-64) zeigen, dass eine Vorinkubation mit Desferal wirkungslos ist. Dies bestätigt die Vermutung, dass der Fluoreszenzanstieg vorwiegend auf der Reduktion der Sonde **45** zum fluoreszierenden Hydroxylamin beruht.

4.4.4.3 Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch Fe(III) / 8-HQ

Die Schädigung durch Fe(III)/8-HQ (15µM/30µM) sollte wiederum zu einer erhöhten Fluoreszenz im Vergleich zu den mit Verbindung **45** beladenen, nicht geschädigten Zellen führen. Für die Untersuchungen wurden Rattenhepatozyten (Primärkultur) mit 10 µM und 50 µM des Farbstoffes **45** beladen. Der zur Schädigung der Zellen verwendete KH-Puffer enthielt den membrangängigen Fe(III)/8-Hydroxychinolin-Komplex (15 µM Eisen(III)-chlorid/30 µM 8-HQ). Aufgrund des DMSO-Anteils (1 %) sollten vorwiegend Methylradikale aus den hierbei auftretenden Hydroxyl-Radikalen gebildet werden. Alle Messungen erfolgten sofort nach Zugabe der Verbindung **45** (Abbildung 4-65).

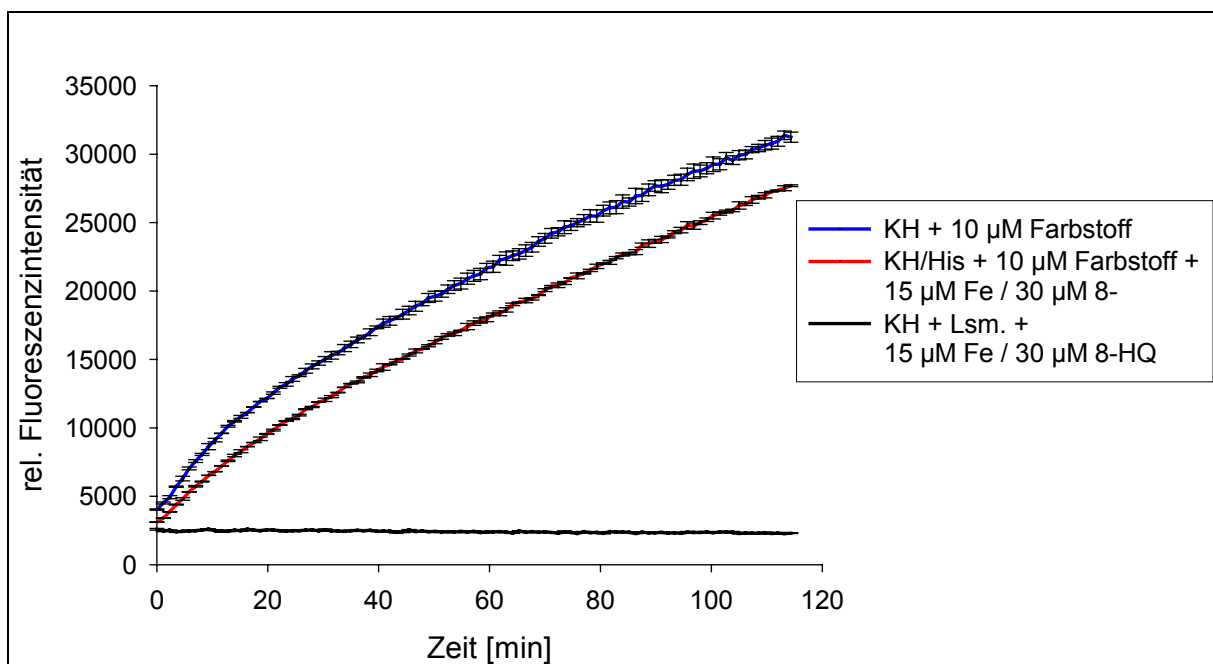


Abbildung 4-65: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2000): Schädigung von Rattenhepatozyten durch Fe(III)/8-HQ; Beladung mit 10 µM BDPNO **45**.

Durch Zugabe von Fe(III)/8-HQ wurde kein erhöhter Fluoreszenzanstieg erzeugt. Da die Werte sogar unter den Werten der nicht geschädigten Zellen (Abbildung 4-65, KH+10 μ M BDPNO) liegen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das Eisen entweder direkt oder durch Kaskaden die Zerstörung des Farbstoffes bewirkt.

4.4.4.4 Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch KCN und Menadion (Hepatozyten)

Durch den Zusatz von Kaliumcyanid (Unterbrechung der Atmungskette → Fehlübertragungen von Elektronen) bzw. 2-Methyl-1,4-naphtochinon (Menadion, membrangängiges Vitamin K-Derivat) erfolgt eine Erhöhung der Superoxid-Produktion in den Zellen. Bei einem Abfang der Superoxid-Radikale durch den Farbstoff **45** sollte eine erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den mit Verbindung **45** beladenen, nicht geschädigten Zellen auftreten. Für diese Untersuchung wurden Rattenhepatozyten (Primärkultur) mit 10 μ M des Farbstoffes **45** beladen. Zur Schädigung der Zellen wurde der verwendete KH-Puffer mit 1 mM KCN bzw. 30 μ M Menadion versetzt. Alle Messungen erfolgten sofort nach Zugabe der Verbindung **45** (Abbildung 4-66).

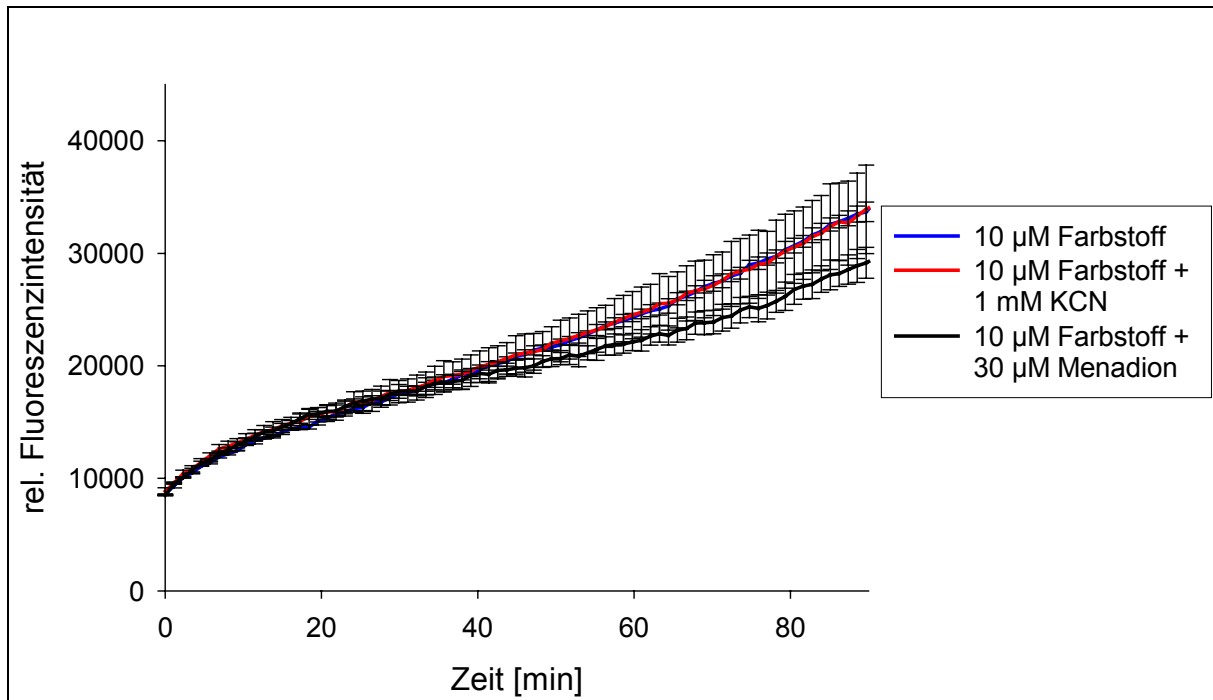
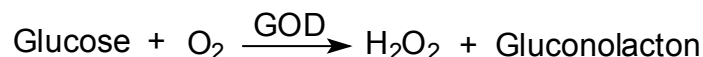


Abbildung 4-66: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2200): Schädigung von Rattenhepatozyten durch KCN und Menadion; Beladung mit 10 µM BDPNO **45**.

Sowohl die durch KCN als auch die durch Menadion geschädigten Zellen zeigen keine erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den mit Verbindung **45** beladenen, nicht geschädigten Zellen. Die mit Menadion beladenen Zellen weisen sogar eine Fluoreszenzintensität auf, die leicht unterhalb der Referenz (10 µM BDPNO, Abbildung 4-66) liegt.

4.4.4.5 Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch D-Glucose/GOD ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und D-Glucose/Fe(III)/8-HQ ($\cdot\text{OH}$)

Die bisherigen Messungen haben gezeigt, dass die Detektion von Radikalen in Hepatozyten mit der Sonde **45** wahrscheinlich aufgrund der Überlagerung durch die Reduktion zum fluoreszierenden Hydroxylamin nicht möglich ist. Daher wurden für die folgenden Messungen Fibroblasten (L929) verwendet, welche sich durch einen sehr geringen Ascorbatanteil auszeichnen. Der Zusatz von D-Glucose (10 mM) und Glucoseoxidase (GOD, 50 bzw. 100 U/L) bewirkt eine vermehrte Erzeugung von Superoxid-Radikalanionen in den Zellen.



Als weiteres Schädigungsmodell wurde die erhöhte Hydroxylradikal-Produktion durch Zusatz von D-Glucose (10 mM) und Fe(III)/8-HQ (30 µM/60 µM) gewählt. Die D-Glucose bewirkt in den Zellen einen Anstieg der Reduktionsäquivalente NAD(P)H. Diese reduzieren vermehrt Fe(III) zu Fe(II), wodurch wiederum verstärkt die Fenton-Reaktion abläuft. Um auszuschließen, dass die Glucose Ursache eines möglichen Fluoreszenzanstiegs ist, wurden die Zellen zuvor ausschließlich mit 10 mM D-Glucose in KH-Puffer und 10 µM des Farbstoffs **45** bzw. zum Vergleich nur mit 10 µM **45** beladen. Zudem wurde diese Messung analog ohne Zellen durchgeführt, um die Auswirkung einer derart hohen D-Glucose-Konzentration auf die Verbindung **45** als Reduktionsmittel zu untersuchen. Die erhaltenen kontinuierlichen Fluoreszenzspektren sind in den Abbildungen 4-67 und 4-68 dargestellt.

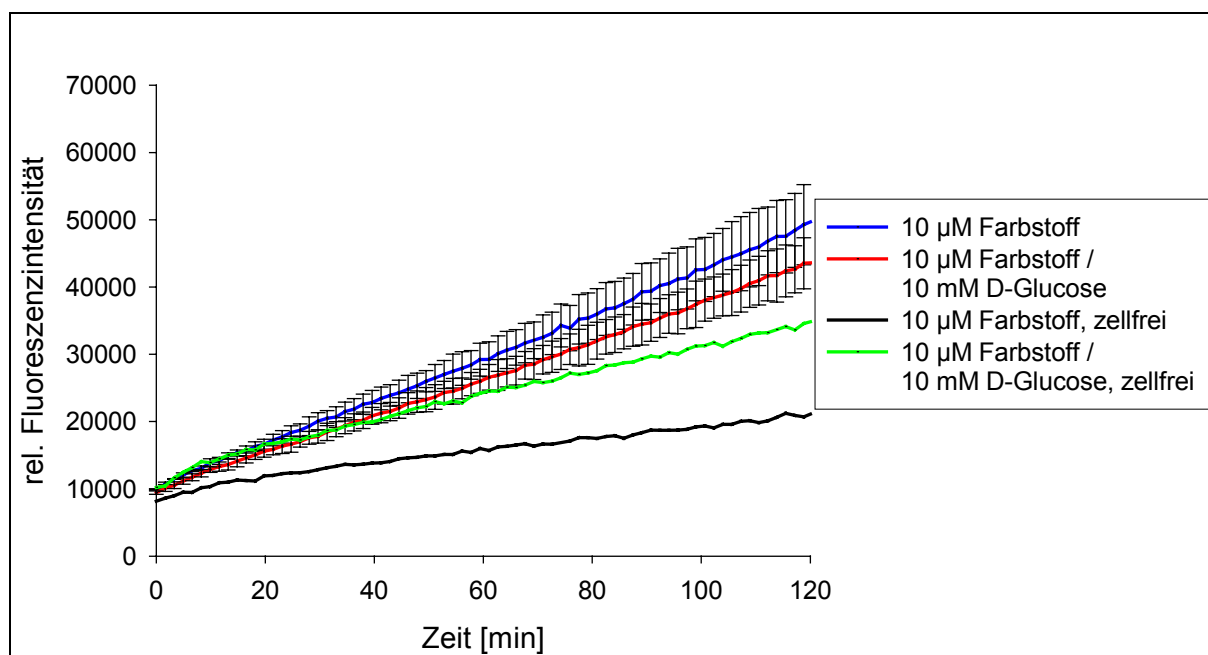


Abbildung 4-67: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2500) mit Fibroblasten (L929): Untersuchung zur Auswirkung von 10 mM Glucose auf den Farbstoff BDPNO **45** (10 µM) .

Die zellfreien Messungen zeigen, dass D-Glucose – obwohl sie im hohen Überschuss vorliegt (D-Glucose/BDPNO **45** = 1000/1) – im Vergleich zu Ascorbinsäure (4.3.10.3) nur wenig reduzierend auf den Farbstoff **45** wirkt. In der

Zelle liegen die Werte sogar unter der Referenz (10 μ M BDPNO; Abbildung 4-67), so dass ausgeschlossen werden kann, dass D-Glucose Ursache eines möglichen Fluoreszenzanstiegs bei der Zugabe von GOD bzw. Fe(III)/8-HQ ist.

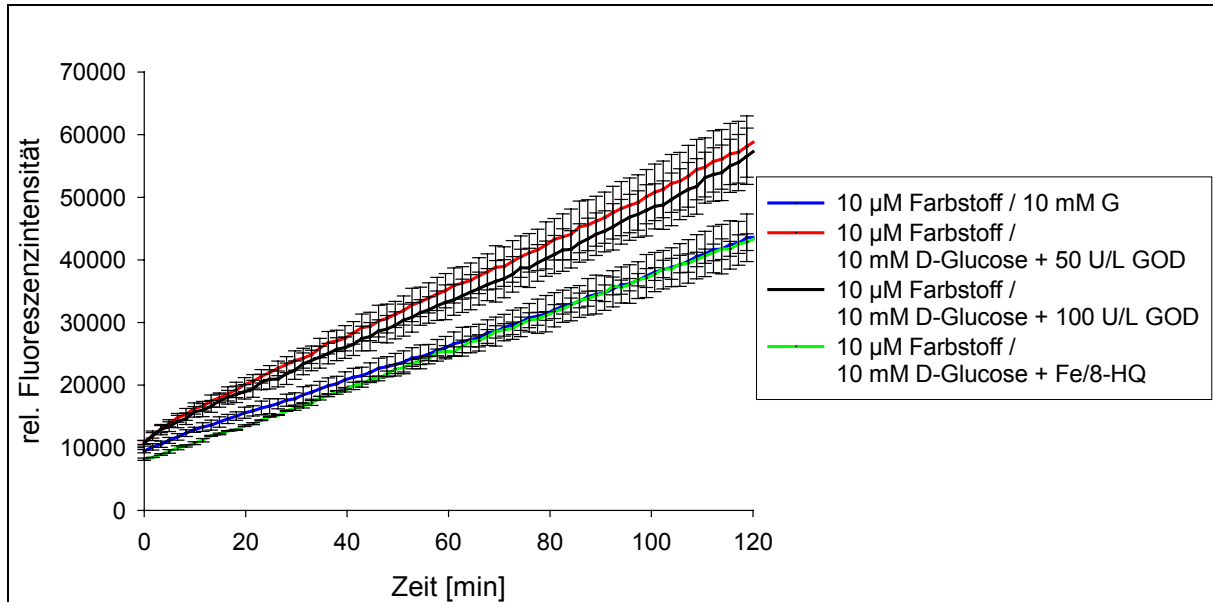


Abbildung 4-68: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2500): Schädigung von Fibroblasten (L929) durch Zusatz von Glucose (G)/GOD und Glucose (G)/Fe(III)/8-HQ; Beladung mit 10 μ M BDPNO **45**.

Abbildung 4-68 zeigt, dass eine Zugabe von D-Glucose/Fe(III)/8-HQ keine Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität hat; die Werte liegen auf der Referenz (10 μ M BDPNO / 10 mM D-Glucose). Dagegen sieht man einen leichten Anstieg bei Erzeugung von Superoxid-Radikalanionen durch D-Glucose/GOD. Eine Verdopplung des Enzyms GOD von 50 auf 100 U/L zeigt allerdings keine Auswirkung.

4.4.4.6 Kontinuierliche Fluoreszenzmessung – Schädigung durch KCN, *tert*-

Butylhydroperoxid und Menadion (Fibroblasten)

Zusätzlich zur Schädigung der Zellen mit Kaliumcyanid und 2-Methyl-1,4-naphtochinon (Menadion, M) (Erhöhung der Superoxid-Produktion in den Zellen) erfolgte bei den Fibroblasten eine Schädigung durch Zusatz von *tert*-Butylhydroperoxid (tBOOH). Im Gegensatz zu den Hepatozyten besitzen Fibroblasten weniger Antioxidantien, die die Hydroperoxide zerstören würden. Daher

sollten in den Fibroblasten O-Alkylradikale und OH-Radikale aus dem *tert*-Butylhydroperoxid entstehen. Die Schädigungen sollten wiederum zu erhöhter Radikal-Bildung und damit erhöhtem Abfang durch den Farbstoff **45** führen. Als Referenz wurden Zellen ausschließlich mit 10 μ M BDPNO **45** beladen. Zur Schädigung der Zellen wurde der verwendete KH-Puffer mit 1 mM KCN, 30 μ M Menadion (M) bzw. 200 μ M tBOOH versetzt. Alle Messungen erfolgten sofort nach Zugabe der Verbindung **45** (Abbildung 4-69).

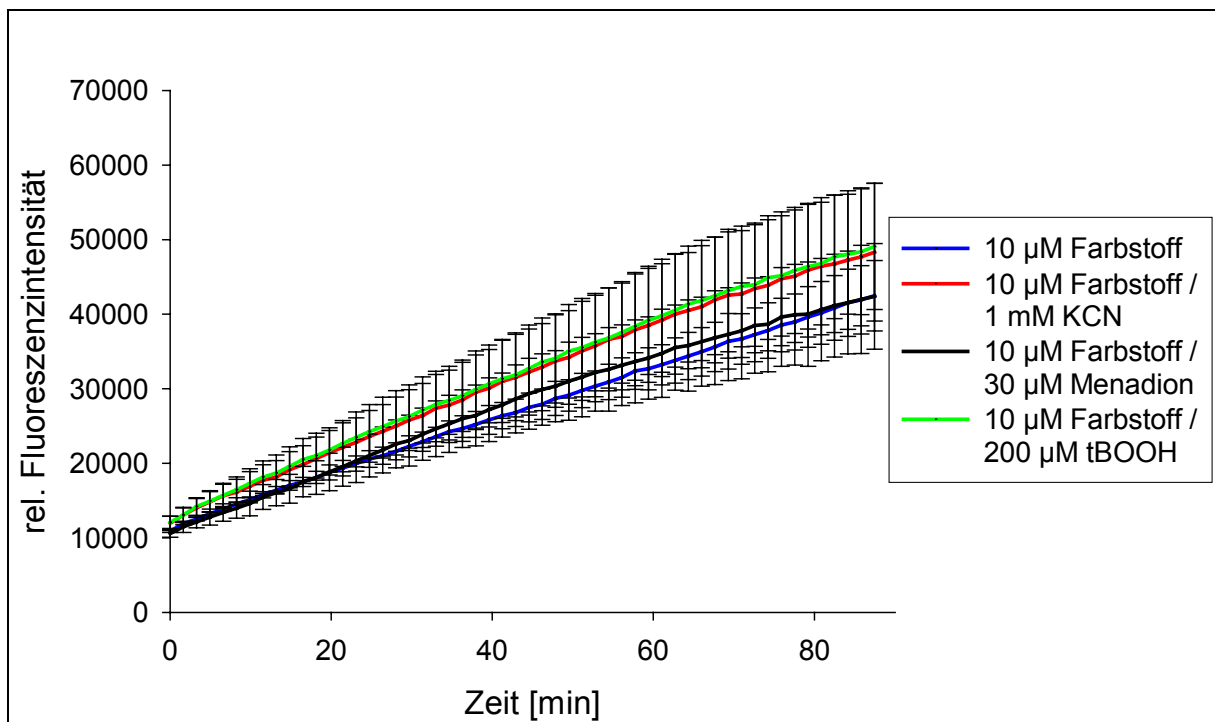
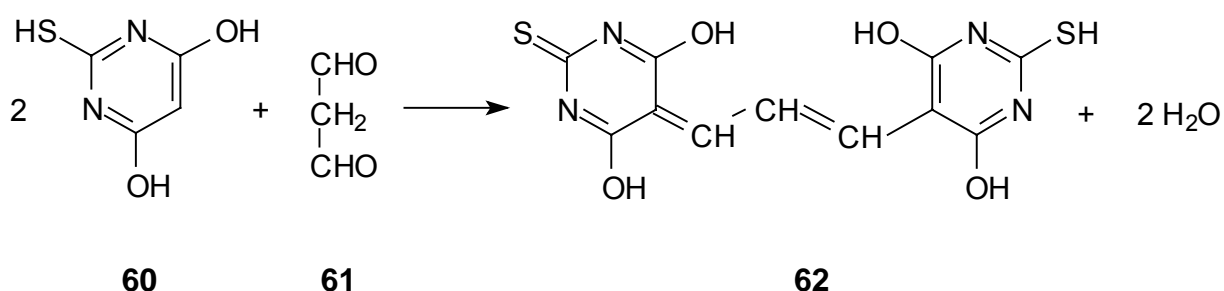


Abbildung 4-69: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung (Verstärkung 2500): Schädigung von Fibroblasten (L929) durch KCN, Menadion und tBOOH; Beladung mit 10 μ M BDPNO **45**.

Im Vergleich zur Referenz ist der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten bei allen Schädigungen minimal und liegt im Fehlerbereich. Da Fibroblasten nur wenig Ascorbat aufweisen, erfolgt ein geringerer Anstieg der Referenz (Verstärkung 2500) im Vergleich zu den Hepatozyten (Verstärkung 2000). Jedoch liegt dieser Anstieg im Bereich des Fluoreszenzanstiegs der geschädigten Zellen. Aufgrund der in den Zellen auftretenden Reduktionsempfindlichkeit des Farbstoffes **45** ist dieser für eine Detektion von Radikalen in vitalen Zellen ungeeignet.

4.4.5 LIPIDPEROXIDATION (MDA-TEST)

Da der Farbstoff **45** wahrscheinlich vorwiegend Radikale der Lipidperoxidation fängt, ist das Modell der stärksten Lipidperoxidation, die Schädigung mit L-Histidin, am sinnvollsten. Jedoch wird die Detektion des Radikalabfanges von der Reduktion des Fängers zum fluoreszierenden Hydroxylamin überlagert, womit Verbindung **45** zur Radikal-Detektion in vitalen Zellen ungeeignet ist. Da Hinweise auf eine Protektivität der Verbindung **45** bezüglich der Lipidperoxidation auftraten, sollte eine entsprechende Untersuchung Klarheit schaffen. Hierfür eignet sich der sogenannte Thiobarbitursäure-Test (TBA) oder Malondialdehyd-Test (MDA). Dieser älteste und am häufigsten angewandte Test zur Messung der Peroxidation von Fettsäuren, Membranen und Nahrung besteht durch seine leichte Durchführbarkeit.^[20] Die Proben werden mit TBA **60** im sauren Milieu erhitzt, wobei TBA mit den bei der Peroxidation entstehenden, geringen Mengen von Malondialdehyd **61** das rote 5-[3-(4,6-Dihydroxy-2-mercapto-pyrimidin-5-yl)-allyliden]-4,6-dihydroxy-5H-pyrimidin-2-thion (**62**) bildet ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$, ($\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$)).



Anhand einer Kalibrierungsgeraden kann somit die Menge an freigesetzten Malondialdehyd **61** mittels UV/Vis-Spektroskopie ($\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$) indirekt bestimmt werden, wodurch Rückschlüsse auf eine Lipidperoxidation bzw. auf eine mögliche Protektivität der Verbindung **45** gezogen werden können. Dabei ist von Bedeutung, dass die Messung mit dem Zellüberstand ohne Zellen erfolgt. Bereits im Jahr 1958 konnte gezeigt werden, dass 98 % des Malondialdehyds **61**, welches im TBA-Test reagierte, nicht aus der analysierten Probe stammte, sondern erst durch den Test (Säure, Hitze) eine Lipidperoxidation der Zellen eintrat.^[20] Da die Verbindung **62** und der Farbstoff **45** sehr ähnliche Absorptions- und Emissionsmaxima aufweisen, mussten die Zellen zum Nachweis der Protektivität des Farbstoffes **45** mit diesem vorinkubiert werden (Primärkultur Rattenhepatozyten, 10 μM

Beladungskonzentration, 37 °C, 5.00 % CO₂ / 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %). Als Referenz dienten Zellen, welche ausschließlich mit KH-Puffer vorinkubiert wurden sowie eine Lösungsmittelkontrolle, die neben dem Puffer 1 % DMSO und 0.2 % Pluronic enthielt. Die Zellen wurde nach der Vorinkubation gründlich gewaschen und anschließend mit KH-Puffer bzw. zur Schädigung mit L-Histidin (198 mM) versetztem KH-Puffer beladen. In Abbildung 4-70 sind die Ergebnisse der Untersuchung zur Lipidperoxidation dargestellt.

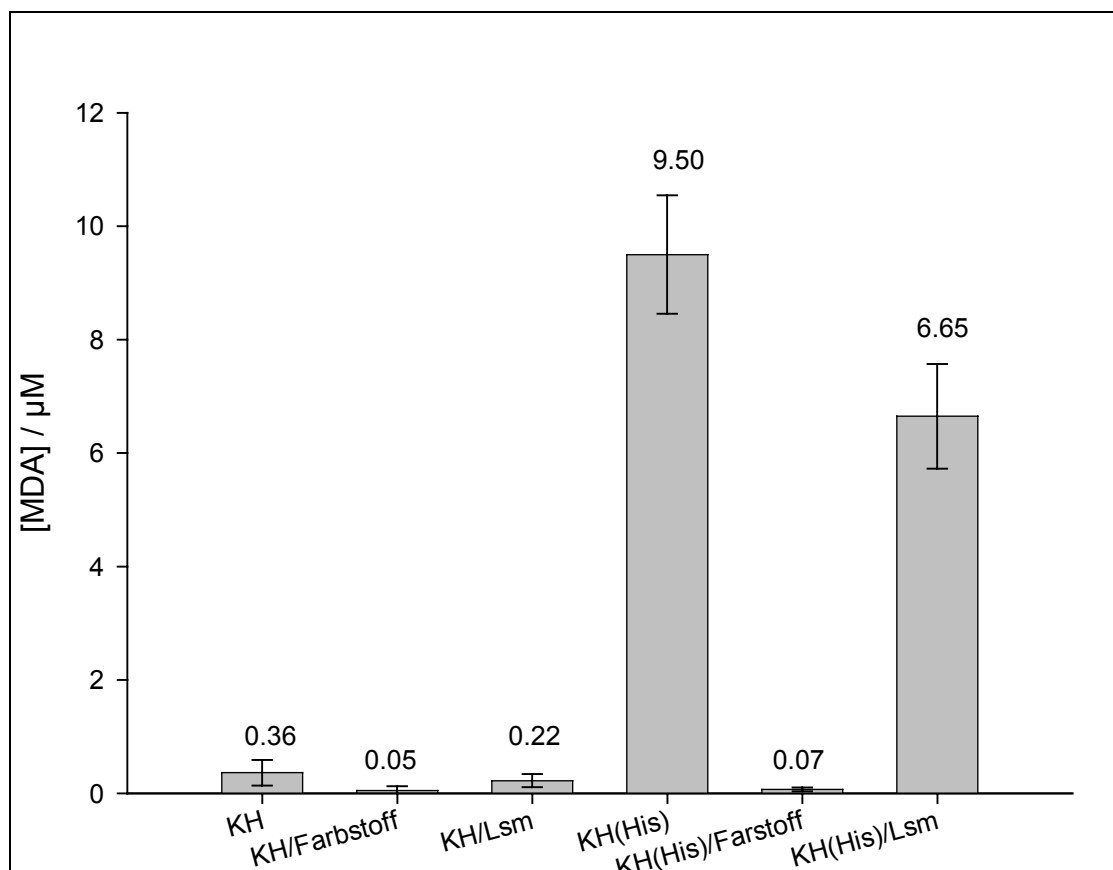


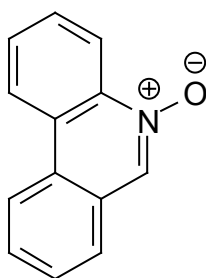
Abbildung 4-70: Untersuchung zur Protektivität von BDPNO **45** in Bezug auf die Lipidperoxidation. Schädigung von Rattenhepatozyten durch L-Histidin, Vorinkubation mit 10 μM BDPNO **45**.

Abbildung 4-70 zeigt das Ausmaß der Zellschädigung durch die Lipidperoxidation nach vier Stunden anhand der MDA-Konzentration. Bereits bei den nicht durch L-Histidin geschädigten Zellen (1. – 3. Balken) ist eine Protektivität des Farbstoffs **45** zu erkennen. Die mit der Verbindung **45** vorinkubierten Zellen (Abbildung 4-69, KH/Farbstoff) zeigen eine mehr als viermal geringere MDA-Konzentration. Die

Untersuchungen der durch L-Histidin geschädigten Zellen (4. – 6. Balken) zeigen sehr deutlich, dass die Nitrosoverbindung **45** eine hohe Protektivität gegen Lipidperoxidation aufweist. Die MDA-Konzentration der mit dem Farbstoff **45** vorinkubierten Zellen (Abbildung 4-70, KH(His)/Farbstoff) entspricht dem Wert der nicht geschädigten Zellen (Abbildung 4-70, KH/Farbstoff). Ohne Vorinkubation ist die MDA-Konzentration etwa 100 Mal höher (Abbildung 4-70, KH(His) und KH(His)/Lsm). Die in Abbildung 4-70 gezeigten Ergebnisse des MDA-Tests bestätigen die Vermutung, dass Verbindung **45** die Lipidperoxidation verhindert.

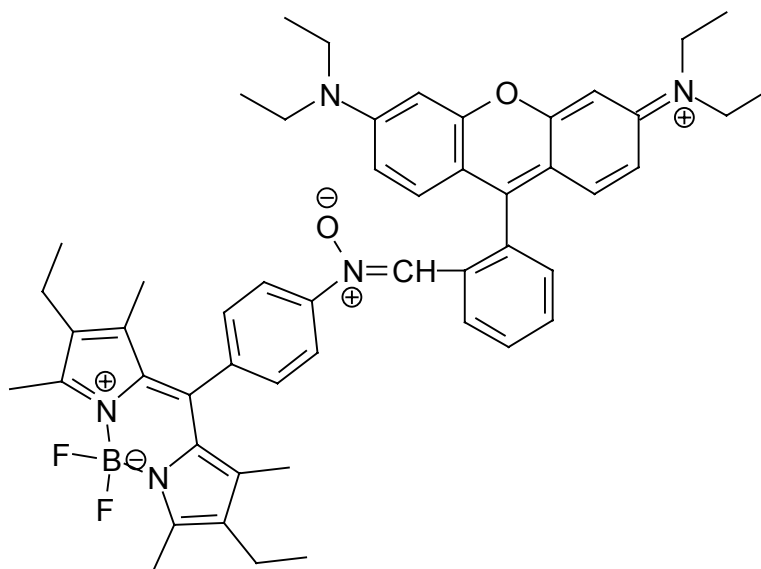
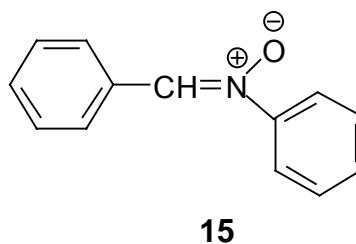
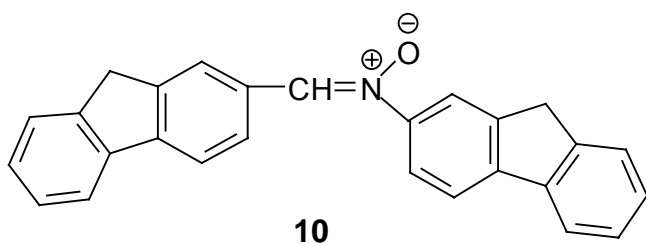
5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit waren die Entwicklung und Anwendung von Fluoreszenzsonden zum selektiven Nachweis der physiologisch und patho-physiologisch sehr bedeutsamen, jedoch aufgrund fehlender Nachweismethoden bislang unzureichend charakterisierten Radikale in vitalen Zellen. Die bis dahin in der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Radikalen verwendeten Nitroxide sollten durch die weniger reduktionsempfindlichen Nitroso-Verbindungen und Nitrone ersetzt werden. Zur Überprüfung von vier möglichen Mechanismen zur fluoreszenzspektroskopischen Detektion von C- und O-zentrierten Radikalen konnten drei literaturbekannte Nitrone sowie sieben neue Radikalfänger erfolgreich synthetisiert werden. Die Untersuchung der literaturbekannten Verbindung **6** zeigte, dass ein direkter Einbau des Nitrons in ein mesomeres System zum Verlust der Eigenschaft des Radikalabfanges führt.

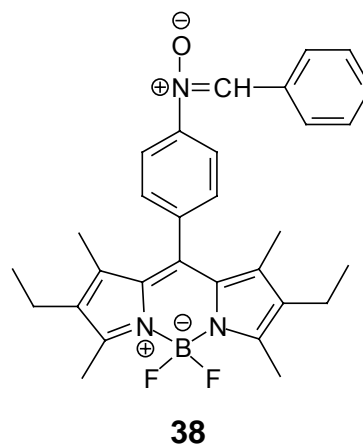
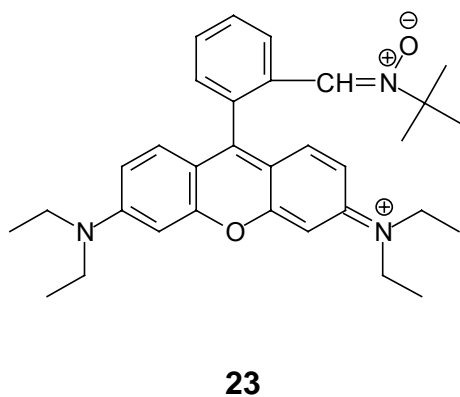
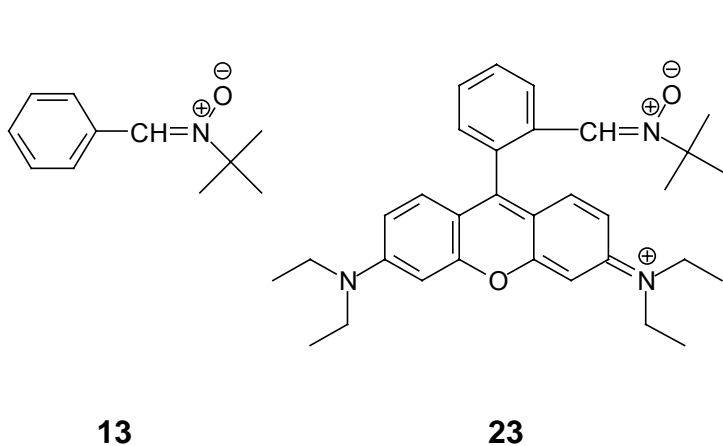


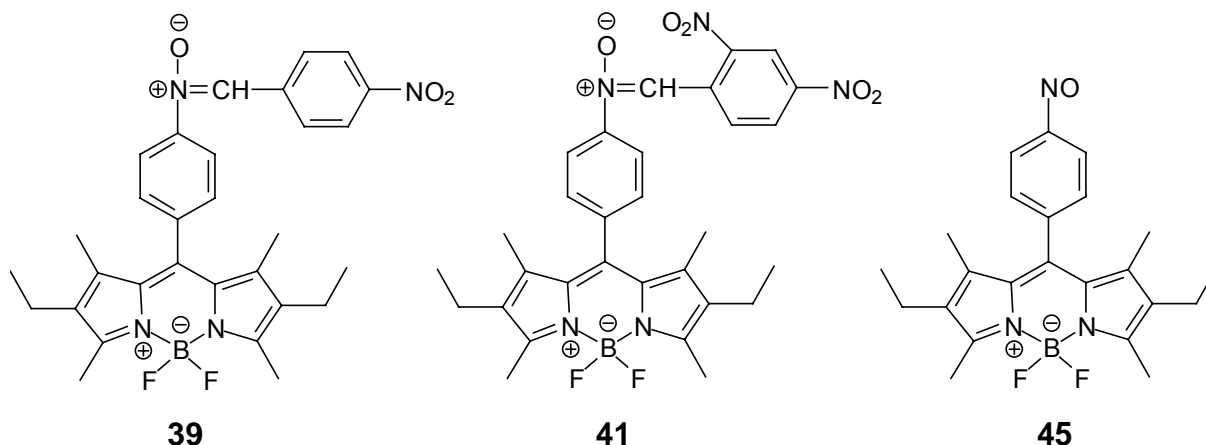
6

Eine zweite Möglichkeit zur Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften nach Radikalabfang bestand in der Annahme einer „Brücken“-Funktion der Nitron-Gruppe zwischen zwei fluorophoren Systemen. Neben dem Energietransfer über konjugierte Bindungen in den Nitronen **15**, **10** und **43** wurde ebenfalls in der Verbindung **43** ein möglicher Energietransfer über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (FRET) untersucht. Die UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopischen Messungen zeigten, dass hierbei keine signifikanten Veränderungen der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der Verbindungen nach Radikalabfang eintreten.

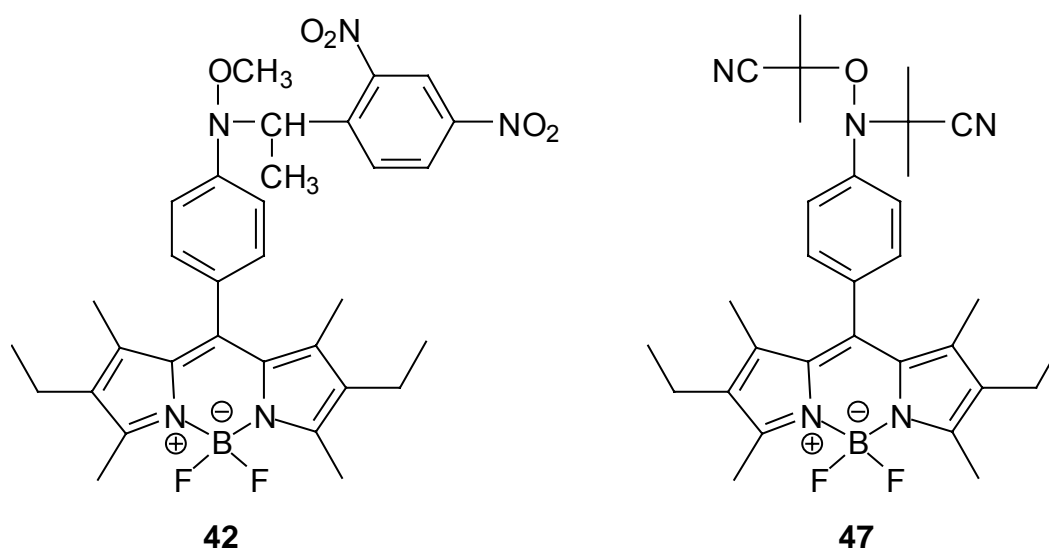


Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Veränderungen in der Fluoreszenzintensität bereits fluoreszierender Stoffe für die Radikal-Detektion ungeeignet ist. Eindeutiger dagegen ist das Auftreten einer Fluoreszenz nach Radikalabfang von zunächst nicht fluoreszierenden Verbindungen. Der Einfluss des durch Radikalabfang eintretenden Wechsels von den Elektronen-Akzeptoren Nitron bzw. Nitroso-Gruppe zu dem Elektronen-Donator, dem Hydroxylamin, auf das angeschlossene mesomere System wurde in den Verbindungen **13**, **23**, **38**, **39**, **41** und **45** untersucht.





Hierbei zeigte sich, dass die Eigenschaft der Fluoreszenzlöschung des Elektronen-Akzeptors lediglich bei Nitrosoverbindungen (**45**) ausreichend ausgeprägt ist. Bei den Nitronen hingegen führte erst der zusätzliche Einbau zweier Elektronen ziehender Nitro-Gruppen zum gewünschten nicht-fluoreszierenden Fänger **41**. Nach Abfang von Radikalen durch die potentiellen Radikalsonden **41** und **45** wiesen beide Sonden eine stark erhöhte Fluoreszenz auf. Die Produkte der Reaktion von Isobutyronitril-Radikalen bzw. Methyl-Radikalen mit den potentiellen Fluoreszenzindikatoren **41** und **45**, die Hydroxylamine **42** und **47**, wurden ebenfalls synthetisiert und zeigten eine vorteilhafte Anregbarkeit im langwelligen Bereich, die das Risiko einer photochemischen Zellschädigung während der Fluoreszenzmessungen sowie die Beeinträchtigung der Messungen durch die zelluläre Eigenfluoreszenz minimiert. Daneben zeichnen sie sich durch eine gute Photostabilität und eine ausreichend hohe Quantenausbeute in wässriger Lösung aus.

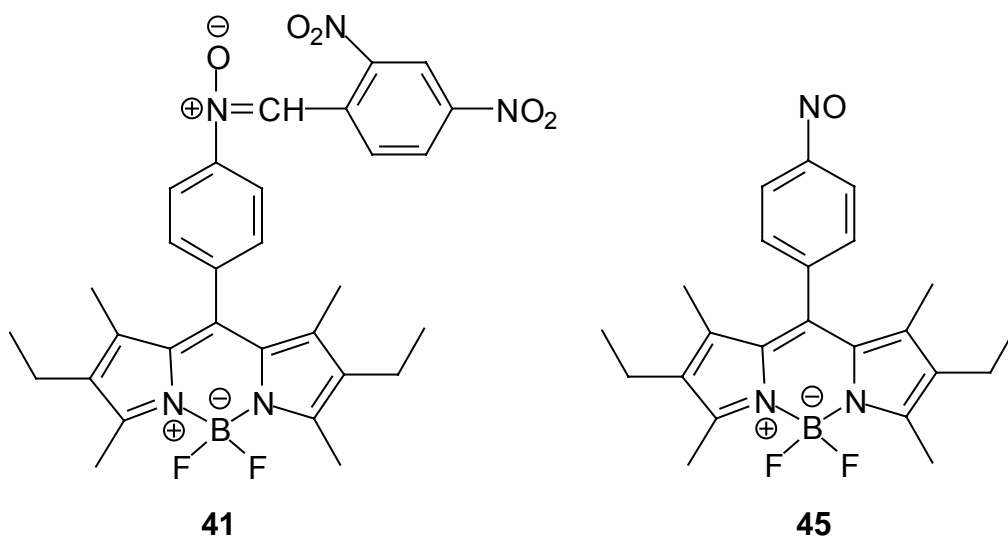


Aufgrund des in vitalen Zellen vorherrschenden reduktiven Milieus sollte eine wesentliche Eigenschaft der Radikalsonden eine möglichst geringe

Reduktionsempfindlichkeit sein. Die zellfreie Untersuchung der Reduktionsempfindlichkeit der potentiellen Fluoreszenzindikatoren **41** und **45** wurde mit verschiedenen, in der Zelle auftretenden Reduktionsmitteln durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Verbindung **41** sehr schnell zum fluoreszierenden Hydroxylamin reagiert. Dies kann durch die verstärkte Elektronenakzeptor-Wirkung erklärt werden. Die bei einer Reduktion auftretende negative Ladung im Aminoxyl-Radikalanion kann über die Nitro-Gruppen optimal delokalisiert werden. Damit ist die Verbindung **41** für eine Anwendung in vitalen Zellen ungeeignet. Die Verbindung **45** zeigte dagegen lediglich eine Reduktionsempfindlichkeit gegenüber Ascorbat (Verhältnis **45**/Ascorbinsäure < 1); hohe Konzentrationen von NADH, Glutathion oder Glucose reduzierten die Nitroso-Verbindung **45** nicht. In nachfolgenden Untersuchungen im zellulären System (Rattenhepatozyten, Primärkultur) konnte eine ausgeprägte Akkumulation des Indikators **45** innerhalb der Zellmembranen sowie in Lipidtröpfchen nachgewiesen werden. Die gute Membrangängigkeit des lipophilen Fängers **45** führt zu einer hohen zellulären Konzentration von 0.91 ± 0.09 mM bei einer Beladungskonzentration von 10 μ M über drei Stunden. In Vitalitätsbestimmungen mit kultivierten Ratten-Hepatozyten zeigte sich, dass die Verbindung **45** nicht cytotoxisch ist und zudem noch stark protektiv wirkt. Insbesondere bei Schädigungsmodellen der Lipidperoxidation konnte ein hoher Grad der Schutzwirkung festgestellt werden, die auf die Lokalisation der Sonde **45** in den Zellmembranen zurückzuführen ist. Durch Abfang der dort auftretenden Radikale kann die Verbindung **45** die Lipidperoxidation verhindern. Die Detektion von Radikalen in vitalen Zellen (Hepatozyten, Fibroblasten) gelang jedoch nicht. Es erfolgte zwar ein Anstieg der Fluoreszenzintensität, der aber wahrscheinlich vor allem auf die Reduktion der Verbindung **45** zum fluoreszierenden Hydroxylamin zurückzuführen ist. Die Intensität der Fluoreszenz nahm zwar bei Schädigung der Zellen zu, jedoch im Vergleich zu den nicht geschädigten Zellen muss der Unterschied als nicht ausreichend betrachtet werden.

6 AUSBLICK

Für die neuen Fluoreszenzindikatoren 4,4-Difluoro-8-[4-(2,4-dinitrophenyl)nitrono]phenyl] 1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**41**) und 4,4-Difluoro-8-(4-nitrosophenyl) 1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**45**) sind vor allem im Hinblick auf Untersuchungen im chemischen System zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten denkbar.



Sowohl der qualitative als auch der quantitative Nachweis von C-zentrierten Radikalen ist in Abwesenheit von Reduktionsmitteln möglich. Mit welcher Genauigkeit die Konzentration diverser Radikale bestimmt werden kann, könnten weiterführende Untersuchungen zeigen. Ob auch eine direkte fluoreszenzspektroskopische Detektion O-zentrierter Radikale möglich ist, könnte durch den Einsatz des $\cdot\text{OCH}_3$ -Radikal generierenden Systems Bleitetraacetat/Methanol geklärt werden.

Auch Untersuchungen in biologischen Systemen sind denkbar. Die bisher in vitro eingesetzten Fluoreszenzindikatoren, welche auch zum Teil kommerziell erhältlich sind, beinhalten ausnahmslos als Fänger-Funktion das Nitroxid. Im Vergleich dazu sollten die Indikatoren **41** und **45** eine bedeutend geringere Reduktionsempfindlichkeit aufweisen und damit genauere Ergebnisse liefern. Weiterführende Experimente könnten darüber Klarheit verschaffen.

Die in dieser Arbeit mit dem Farbstoff **45** durchgeführten Messungen im zellulären System haben gezeigt, dass er sich auch als Hemmstoff zur gezielten Ausschaltung

der Lipidperoxidation eignet. Eine besonders vorteilhafte Eigenschaft dieses Hemmstoffes wäre seine fluoreszenzspektroskopisch kontinuierlich verfolgbare subzelluläre Verteilung.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Instrumentelle Analytik

Die **CHN-Elementaranalysen** wurden im mikroanalytischen Labor der Universität Duisburg-Essen mit dem Elemental Analyser 1010 CHNSO der Firma Carlo Erba (Mailand, Italien) durchgeführt.

Die **ESR-Spektren** wurden mit dem Spektrometer ESP 300E der Firma Bruker aufgenommen.

Die **Fluoreszenzspektren** wurden mit dem Gerät Fluoroscan FL 3095 der Firma J&M (Aalen, Deutschland) aufgenommen.

¹H- und ¹³C-Kernresonanz-Spektren wurden mit dem Gerät Gemini XL 200 (200 MHz) der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) und mit dem Gerät DRX-500 (ADVANCE, 500 MHz) der Firma Bruker (Rheinstetten, Deutschland) gemessen. Die zweidimensionalen Spektren (gs-COSY 90, gs-HMBC, gs-HMQC) wurden mit dem Gerät DRX-500 (ADVANCE) der Firma Bruker gemessen. Die Angabe der chemischen Verschiebungen erfolgte in der Einheit ppm. Als interner Standard dienten jeweils die undeuterten Anteile der verwendeten deuterierten Lösungsmittel. Neben den ¹³C-NMR-Spektren wurden DEPT 135- sowie DEPT 90-Aufnahmen zur Charakterisierung der Produkte verwendet.

Die **kontinuierlichen Fluoreszenzmessungen** wurden mit dem Gerät Fluorostar Optima der Firma BMG Labtech durchgeführt. Zur Auswertung diente die gleichnamige Software der Firma BMG Labtech.

Die **LDH-Titrationsen** erfolgten mit dem Gerät Vitalab Selectra E der Firma Vital Scientific N. V., Dieren/Niederlande (Vertrieb: VWR International GmbH, Darmstadt).

Die hochaufgelösten **Massenspektren** wurden mit einem Gerät der Firma Bruker Daltonic Inc. vom Typ BioTOF III mit Apollo-ESI-Ionenquelle (ESI - Elektrospray Ionisation) (Boston, USA) gemessen. Zur Auswertung der hochaufgelösten Massenspektren wurde das Signal des Isotopenmusters mit der geringsten Masse (*monoisotopic mass*) ausgewählt. Die Aufgabe der Proben erfolgte über eine HPLC-Anlage vom Typ Agilent Serie 1100 und einem automatischen Probengeber vom Typ Gerstel/CTC MPS3.

Das **Molecular Modeling** wurde mit dem Programmpaket Macromodel 6.5, Amber-Kraftfeld durchgeführt. Berechnet wurden hierbei die energieminierten Strukturen der Verbindungen.

Die angegebenen **pH-Werte** wurden mit einem pH-Meter 765 Calimatic der Firma Knick (Berlin, Deutschland) ermittelt.

Die **Schmelzpunkte** (unkorrigiert) wurden unter Verwendung eines Mikroskop-Heiztisches (Reichert Thermovar / Wien, Österreich) oder mit dem Gerät 510 der Firma Büchi (Flawil, Schweiz) bestimmt.

Die **Ultraviolett/Visuell-spektroskopischen Messungen** wurden mit dem Gerät Cary 300 Bio der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland), mit dem Gerät Spectralys der Firma J&M (Aalen, Deutschland) sowie mit dem UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 der Firma Perkin Elmer (Auswertungsprogramm: UvWinlab, Perkin Elmer) durchgeführt.

Die **Zellbilder** wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (inverses Mikroskop Axiovert 100 M mit LSM 510 Laser-Scanning-Modul der Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland) erhalten. Das Gerät ist mit einem Argon- und einem Helium/Neon-Laser ausgerüstet. Der Argon-Laser mit 1 mW (= Maximalleistung) Ausgangsleistung wurde für die Anregung bei $\lambda_{\text{exc.}} = 510 \text{ nm}$ genutzt. Als Objektiv mit numerischer Apertur wurde das 63x NA 1.40 Plan-Apochromat/Oil der Firma Zeiss eingesetzt. Als Emissionsfilter dienten Longpassfilter mit $\lambda_{\text{em.}} \geq 560 \text{ nm}$. Die Temperierung der für die Messungen verwendeten Pentz-Kammern (hergestellt in der Werkstatt der Institutsgruppe I des Universitätsklinikums Essen) erfolgte durch einen elektrisch

heizbaren Mikroskoptisch (Zeiss). Alle Messungen wurden im „Expert Mode“ der LSM 510-Software durchgeführt. Für alle vergleichenden Messungen wurden identische Geräteeinstellungen verwendet.

7.2 Materialien zur Synthese und zur Messung im chemischen System

<i>Acros organics</i>	9-Anthraldehyd, Hydrazin-Monohydrat, Tetrahydrofuran p.a., Rhodium auf Aluminiumoxid (5 %).
<i>Appli Chem</i>	Benzen p.a., Salpetersäure (65 %), Wasserstoffperoxid (30 %).
<i>BDH Laboratory Supplies</i>	Chloroform p.a., Cyclohexan p.a., Dichlormethan p.a., Dimethylformamid p.a., Dimethylsulfoxid p.a., Hexan p.a., Methanol p.a.
<i>Fluka</i>	Aceton p.a., Aluminiumoxid (basisch), Aluminiumoxid (neutral), Ammoniumchlorid, Eisen(III)-chlorid (wasserfrei), Lithiumaluminiumhydrid, Natrium, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumsulfat, Nitrobenzol, 4-Nitrochinolin, Palladium auf Aktivkohle (5 % und 10 %), Phosphor(V)-oxid, Pyridiniumchlorochromat, Zink-Pulver.
<i>Griesheim</i>	Argon.

<i>J.T. Baker</i>	Chloroform p.a., Essigsäure (98 %), Ethylacetat p.a., Salzsäure (38 %), Schwefelsäure (96 %), Toluol p.a..
<i>Lancaster</i>	N, α -Diphenylnitron.
<i>Merck</i>	Aluminiumoxid (basisch, für DC), Aluminiumoxid (neutral, für DC), Benzophenon, Di- <i>tert.</i> -Butylperoxid, Eisen(II)-chlorid, Kaliumchlorid, Kieselgel 60 (0.5 mm-2 mm), Lichroprep®RP18 (40-63 μ m), Methyllithium, Natriumacetat, Natriumhydroxid, Peressigsäure, Pyren, Salpetersäure (rauchend, 100 %), Celite ^(T) 545.
<i>Macherey-Nagel</i>	Alugram RP-18W/UV für DC.
<i>Molecular Probes</i>	Pluronic, Rhodamin B.
<i>Riedel-de-Haën</i>	Ammoniumsulfid (21 %, wässrig), Pivalinaldehyd, Trifluoressigsäure.
<i>Roth</i>	Ethanol p.a., Florisil (60-100 mesh).
<i>Sigma-Aldrich</i>	L-Ascorbinsäure, Azoisobutyronitril, Benzaldehyd, Bortrifluorid-Diethylether, <i>tert.</i> -Butylhydroxylamin, Chelex Resin 100, Chloroform-d ₁ , 2,3-Dichlor-5,6-dicyan- <i>p</i> -benzochinon, 2,4-Dimethyl-3-ethylpyrrol, Dimethylsulfoxid-d ₆ , 2,4-Dinitrobenzaldehyd, Eisen(II)-chlorid (wasserfrei), D-Glucose, Methansulfonsäure, <i>p</i> -Nitrobenzaldehyd, 2-Nitrofluoren, 2-Fluorenylcarbaldehyd, Phenanthridin, THF-d ₈ , Triethylamin.

7.3 Trocknung der Lösungsmittel

Die Feintrocknung von **Acetonitril** erfolgte durch zehnstündiges Sieden über Calciumhydrid und nachfolgende Destillation.

Die verwendeten **deutერიerten Lösungsmittel** wurden über Molekularsieb getrocknet und aufbewahrt.

Dimethylformamid wurde durch Destillation und anschließende Filtration über neutralem Aluminiumoxid absolutiert.

Ethanol wurde mit 7.0 g Natrium und 27.5 g Phthalsäurediethylester je Liter versetzt, eine Stunde unter Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert.

Die verwendeten **sauerstofffreien Lösungsmittel** wurden durch 30-minütiges Spülen mit Argon 5.0 (Reinheit 99.999 %) der Firma Griesheim erhalten.

Tetrahydrofuran wurde mit Natrium zum Sieden erhitzt, bis sich aus dem zugesetzten Indikator *p*-Phenylbenzophenon das violettfarbene Ketylradikalanion bildete. Anschließend wurde abdestilliert.

Toluol wurde mit Natrium versetzt und zum Sieden erhitzt. Nachdem der zugesetzte Indikator *p*-Phenylbenzophenon das violettfarbene Ketylradikalanion bildete, wurde unter Schutzgas abdestilliert.

Nach dem Trocknungsvorgang wurden alle Lösungsmittel über Molekularsieb unter Schutzgas aufbewahrt.

7.4 Materialien für biologische Anwendungen

<i>Assistent</i>	Glas-Deckplättchen.
<i>Becton Dickinson</i>	Falcon 6well, 24well und 96well Zellkulturschalen, Falcon Zellkulturflaschen.
<i>Fluka</i>	1,1,3,3-Tetramethoxypropan.
<i>Griesheim</i>	Kohlenstoffdioxid.
<i>Gibco</i>	Leibovitz L-15 Medium, RPMI 1640-Medium.
<i>Merck</i>	Calciumchlorid, Dimethylsulfoxid p.a., L-Histidin, 2[4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-iperaziny]ethansulfonsäure (HEPES), 8-Hydroxychinolin, Kaliumchlorid, Kaliumcyanid, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Thiobarbitursäure, Trichloressigsäure, Trinatriumcitrat-Dihydrat, Triton X-100.
<i>Molecular Probes</i>	Pluronic.
<i>Novartis</i>	Desferal.
<i>PAA Laboratories</i>	Penizillin/Streptomycin.
<i>Riedel-de Haën</i>	Ethanol p.a..
<i>Roche Molecular Biochemicals</i>	Fibronektin, NADH (Dinatriumsalz).
<i>Sarstedt</i>	Eppendorf-Cups.

Serva Dexamethason, Gentamicin, Kollagen (Typ R), Natriumdodecylsulfat, Rinderserumalbumin.

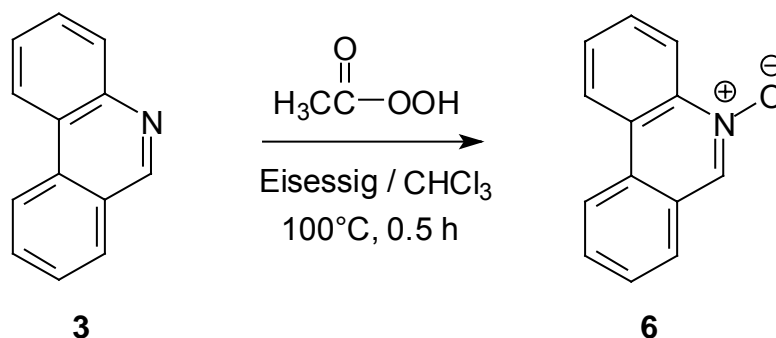
Sigma-Aldrich: L-Ascorbinsäure, *tert*-Butylhydroperoxid, Chelex Resin 100, Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat, fötales Kälberserum, D-Glucose, L-Glutamin, Glutathion, 8-Hydroxychinolin, Imidazol, Kollagenase, Menadion, Natriumpyruvat, Propidiumiodid, Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris).

7.5 Versuchstiere

Die Experimente im zellulären System wurden mit Hepatozyten (Primärkultur) und mit Fibroblasten (Zelllinie) durchgeführt. Für die Hepatozytenisolation^[84] wurden männliche Ratten des Wistar-Stammes (180 - 350 g) vom Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen bezogen. Für die Isolation der Fibroblasten^[83] wurden Mäuse des Murin-Stammes – ebenfalls vom Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen – verwendet. Die Versuchstiere wurden unter Standardbedingungen (Temperatur: 21 ± 2 °C, relative Luftfeuchte: 55 ± 5 %, konstanter Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden, Standardfutter und Wasser (*ad libitum*) in Übereinstimmung mit den geltenden Tierschutzgesetzen gehalten.

7.6 Synthese der Fluoreszenzindikatoren

7.6.1 PHENANTHRIDIN-N-OXID (**A1**)^[68]

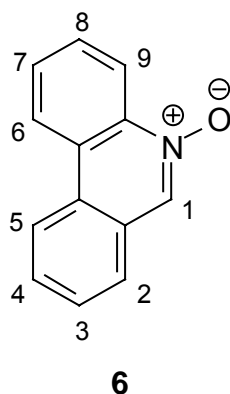


In einem Zweihalskolben mit Rückflusskühler und Tropftrichter wurden 5 mL Peressigsäure in 15 mL Eisessig zu 3.58 g Phenanthridin (**3**) in 30 mL Chloroform p.a. getropft. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 100 °C (Ölbad) gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 50 mL Wasser und 50 mL Chloroform p.a. hinzugegeben und die überschüssige Peressigsäure mit konzentrierter Natronlauge (762 g/L) zerstört. Dabei fand die Reaktion (Gasentwicklung) erst im neutralen bis alkalischen Medium statt. Die Phasen wurden voneinander getrennt und die wässrige Phase mit insgesamt 170 mL Chloroform p.a. extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Salzsäure (6 mol/L) und Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde ohne vorherige Trocknung am Rotationsverdampfer entfernt und der zurück gebliebene farblose Feststoff mit verdünnter Natronlauge verrieben, scharf abgesaugt und im Vakuumexsikkator über Blaugel getrocknet.

Ausbeute: 3.16 g (16.2 mmol) Phenanthridin-N-oxid (**6**), 81 %

Schmelzpunkt: 225-228 °C (Lit.^[68]: 226-228 °C)

Charakterisierung:

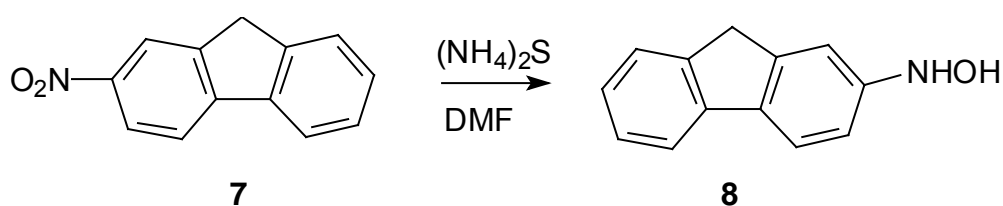


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.95-8.92 (dd, 1H, 8-H, $^3\text{J}\{8\text{-H}, 7\text{-H}\} = 9.60$ Hz, $^3\text{J}\{8\text{-H}, 9\text{-H}\} = 7.80$ Hz), 8.89 (s, 1H, 1-H), 8.60-8.58 (dd, 1H, 7-H, $^3\text{J}\{7\text{-H}, 8\text{-H}\} = 9.60$ Hz), 8.52-8.50 (d, 1H, 9-H, $^3\text{J}\{9\text{-H}, 8\text{-H}\} = 7.80$ Hz), 7.86-7.78 (m, 3H, 2-H, 5-H, 6-H), 7.76-7.73 (dd, 1H, 4-H, $^3\text{J}\{4\text{-H}, 3\text{-H}\} = 7.10$ Hz), 7.69-7.65 (dd, 1H, 3-H, $^3\text{J}\{3\text{-H}, 4\text{-H}\} = 7.10$ Hz).

Elementaranalyse:

berechnet (für $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}$):	C 79.98	H 4.65	N 7.18
gefunden:	C 80.24	H 4.62	N 7.07

7.6.2 2-HYDROXYLAMINOFLUOREN (**8**)



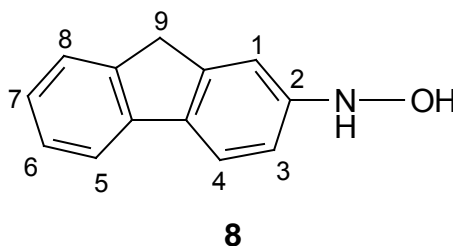
Zur Lösung von 2.50 g (11.6 mmol) der Nitroverbindung **7** in 190 mL DMF wurde bei -5°C unter Argon tropfenweise innerhalb von 45 Minuten 130 mL wässrige Ammoniumsulfid-Lösung (21 %) gegeben. Die Lösung wurde 21 h im Eisbad gerührt, wobei sich die Reaktionsmischung langsam auf 21°C erwärmte. Es wurden 500 mL Diethylether (p.a., sauerstofffrei, 4°C) und 250 mL Wasser (sauerstofffrei, 4°C) zur Reaktionsmischung gegeben und unter Argon extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch fünfmal mit je 100 mL Diethylether (p.a., sauerstofffrei, 4°C) extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 50 mL Wasser (sauerstofffrei, 4 °C) gewaschen, bis die Etherphase nur noch hellgelb gefärbt und das Waschwasser farblos war. Die organische Phase wurde 2 h über wasserfreiem Natriumcarbonat getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer unter Argon eingeengt. Das gelbe Rohprodukt (1.90 g) wurde mit 25 mL Chloroform (p.a., sauerstofffrei) bei Raumtemperatur 30 min digeriert, unter Argon filtriert (D3) und im Ölpumpenvakuum bei Raumtemperatur getrocknet. Die NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte eine Reinheit von 97 % mit einem Anteil von 3 % Edukt.

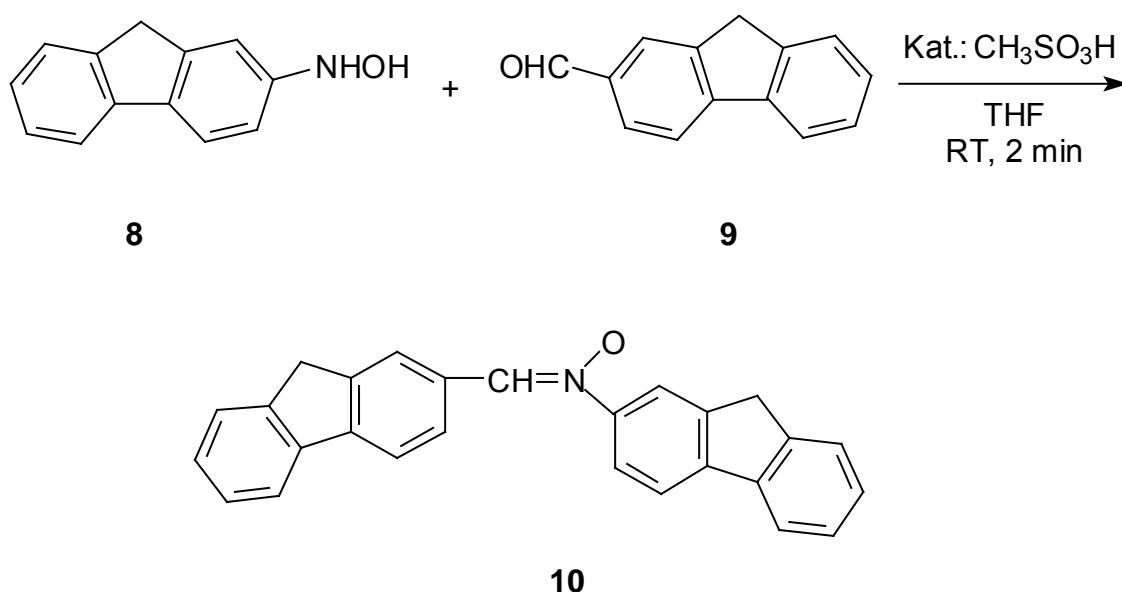
Ausbeute: 1.50 g (7.60 mmol) 2-Hydroxylaminofluoren (**8**), 66 %.

Schmelzpunkt: 169-171 °C (Lit.^[85] 170-175 °C)

Charakterisierung:



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.64-7.63 (m, 3H, OH, NH, 5-H), 7.60-7.58 (d, 1H, 4-H, ³J{4-H, 3-H} = 8.20 Hz), 7.44-7.42 (d, 1H, 8-H, ³J{8-H, 7-H} = 7.40 Hz), 7.26-7.23 (dd, 1H, 6-H, ³J{6-H, 7-H} = 7.60 Hz, ³J{6-H, 5-H} = 7.40 Hz), 7.14-7.11 (m, 2H, 1-H, 7-H, ³J{7-H, 8-H} = 7.40 Hz, ³J{7-H, 6-H} = 7.60 Hz), 6.90-6.88 (dd, 1H, 3-H, ³J{3-H, 4-H} = 8.20 Hz, ⁴J{3-H, 1-H} = 1.90 Hz), 3.79 (s, 2H, 9-H).

7.6.3 FLUORENYL-(α -FLUORENYL)-AMIN-N-OXID (**10**)

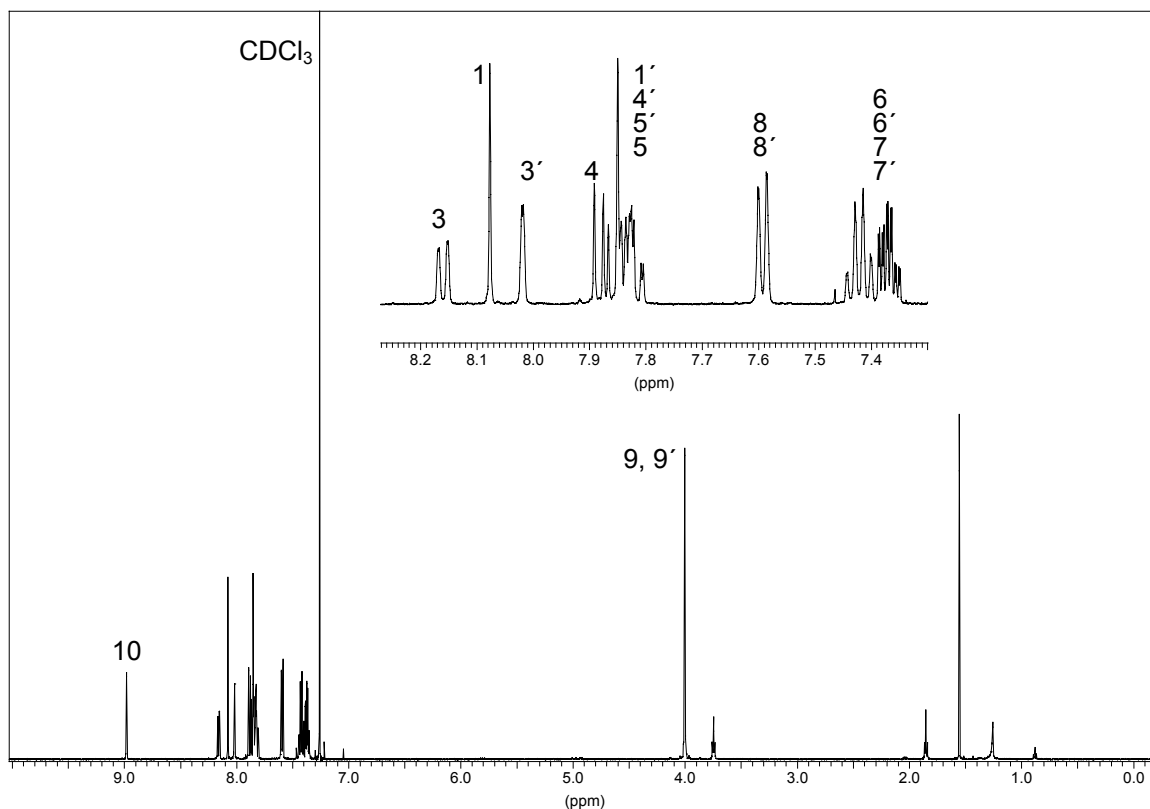
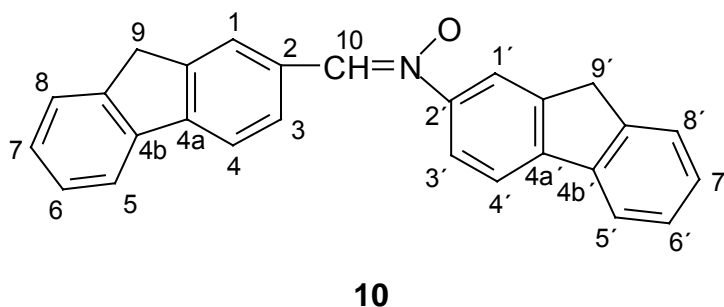
Zur gelben Lösung von 1.43 g (7.30 mmol) Aldehyd **9** in 10 mL Tetrahydrofuran (p.a., sauerstofffrei) wurde unter Argon die ebenfalls gelbe Lösung des Hydroxylamins **8**, 1.50 g (7.30 mmol) in 30 mL THF (p.a., sauerstofffrei), gegeben. Direkt nach der Zugabe des Katalysators Methansulfonsäure (7.14 μ L, 0.11 mmol) fiel ein gelber Feststoff aus. Nach zweiminütigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung auf 4 °C abgekühlt, der Feststoff unter Argon abfiltriert (D3) und mit THF (p.a., sauerstofffrei) gewaschen. Der hellgelbe Feststoff wurde bei Raumtemperatur im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Das ¹H-NMR zeigte eine 99 proz. Reinheit mit einem Anteil von 1 % der Edukte, da Verbindung **10** selbst in entsäuertem CDCl₃ leicht hydrolysiert).

Ausbeute: 2.49 g (6.67 mmol) Fluorenyl-(α -fluorenyl)-amin-N-oxid (**10**), 91 %.

Schmelzpunkt: 241 °C (Zersetzung)

Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.98 (s, 1H, 10-H), 8.17-8.15 (d, 1H, 3-H, $^3J\{3\text{-H}, 4\text{-H}\} = 8.00$ Hz), 8.08 (s, 1H, 1-H), 8.021-8.019 (d, 1H, 3'-H, $^3J\{3'\text{-H}, 4'\text{-H}\} = 1.30$ Hz), 7.89-7.88 (d, 1H, 4-H, $^3J\{4\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.00$ Hz), 7.87-7.80 (m, 4H, 1'-H, 4'-H, 5'-H, 5-H), 7.60-7.59 (m, 2H, 8'-H, 8-H), 7.43-7.37 (m, 4H, 6-H, 6'-H, 7-H, 7'-H), 4.00 (s, 4H, 9-H, 9'-H), 3.74-1.85 (THF), 1.55 (H_2O), 1.25-0.88 (Schliffett).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 148.12 (4a'-C), 144.63 (2-C), 144.54-144.33 (9a-C, 9a'-C), 144.02-143.73 (4b-C, 4b'-C), 143.54 (2'-C), 141.14-140.51 (8a-C, 8a'-C), 135.06 (1-C), 129.51 (4a-C), 128.95 (3-C), 127.80-127.73 (6-C, 6'-C), 127.25-127.13 (7-C, 7'-C), 125.39-125.37 (8-C, 8'-C), 125.28 (10-C), 120.79 (1'-C),

120.63-120.61 (4-C, 4'-C), 120.16-120.09 (5-C, 5'-C), 118.88 (3'-C), 37.21-37.18 (9-C, 9'-C).

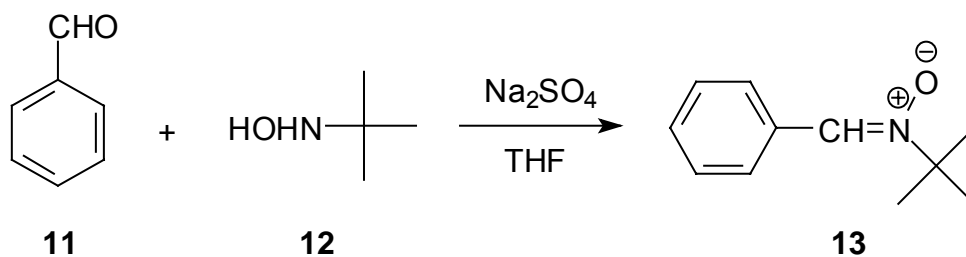
Elementaranalyse:

berechnet (für C ₂₇ H ₁₉ NO):	C 86.84	H 5.13	N 3.75
gefunden:	C 87.09	H 5.32	N 3.86

UV-Vis (DMSO, 22 °C) :

$\lambda_{\max}(\lg \varepsilon) = 312 \text{ nm (4.785)}, 363 \text{ nm (4.605)}.$

7.6.4 N-*TERT.*-BUTYL- α -PHENYLNITRON (**A8**)^[86]

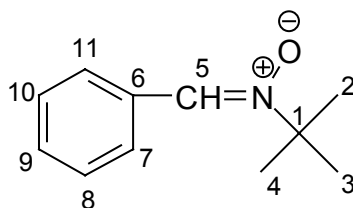


Zu einer Lösung von 854 mg (5.73 mmol) *tert.*-Butylhydroxylamin (**12**) in 5.00 mL THF p.a. wurden unter Schutzgas zur Bindung des Reaktionswassers 1.14 g Natriumsulfat gegeben und anschließend eine Lösung von 609 mg (5.73 mmol) Benzaldehyd (**11**) in 5.00 mL THF p.a. aus der Pipette zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde vier Tage unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt, anschließend filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der ölige Rückstand wurde in Cyclohexan umkristallisiert. Bei der Verbindung **13** handelt es sich um einen farblosen Feststoff.

Ausbeute: 392 mg (2.21 mmol) N-*tert.*-Butyl- α -phenylnitron (**13**), 39 %.

Schmelzpunkt: 74 °C (Lit.^[87]: 72-74 °C)

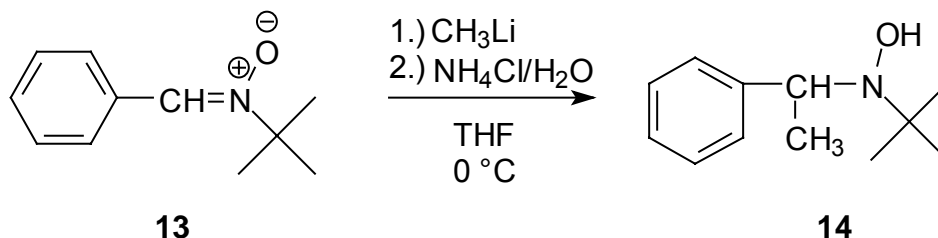
Charakterisierung:



13

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 8.33-8.31 (m, 2H, 7-H, 11-H), 7.91 (s, 1H, 5-H), 7.47-7.46 (m, 3H, 8-H, 9-H, 10-H), 1.61 (s, 9H, 2-H, 3-H, 4-H).

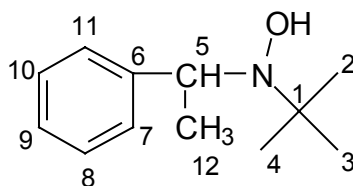
7.6.5 N-*tert*.-BUTYL-N-(1-PHENYLETHYL)HYDROXYLAMIN (**14**)^[70]



3 mL einer 1.60 M Lösung von Methyllithium in Diethylether (4.80 mmol) wurden auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und eine Lösung von 132 mg (0.75 mmol) N-*tert*.-Butyl- α -phenylnitron (**13**) in 4.00 mL THF p.a. zugetropft. Die Temperatur wurde dabei unter $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten. Anschließend wurde noch 30 Minuten gerührt, wobei die Temperatur auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ anstieg. Die Reaktionsmischung wurde mit 5 mL wässriger Ammoniumchlorid-Lösung (20 %) versetzt und weitere 10 Minuten gerührt, wobei sich überschüssiges Methyllithium unter starkem Aufschäumen zersetzte. Nach Abtrennung der organischen Phase wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das hellgelbe Öl im Ölpumpenvakuum bei Raumtemperatur bis zur Massenkonzanz getrocknet.

Ausbeute: 126 mg (0.65 mmol) N-*tert*.-Butyl-N-(1-phenylethyl)hydroxylamin (**14**), 87 %.

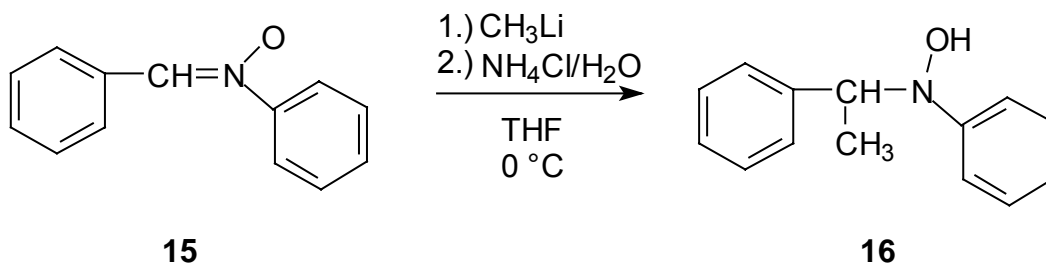
Charakterisierung:



14

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.45-7.43 (m, 2H, 7-H, 11-H, $^4J\{7/11\text{-H}, 9\text{-H}\} = 1.35$ Hz, $^3J\{7/11\text{-H}, 8/10\text{-H}\} = 7.10$ Hz), 7.26-7.23 (m, 2H, 8-H, 10-H, $^3J\{8/10\text{-H}, 9\text{-H}\} = 7.53$ Hz, $^3J\{8/10\text{-H}, 7/11\text{-H}\} = 7.10$ Hz), 7.19-7.15 (m, 1H, 9-H, $^4J\{9\text{-H}, 7/11\text{-H}\} = 1.35$ Hz, $^3J\{9\text{-H}, 8/10\text{-H}\} = 7.53$ Hz), 4.16-4.12 (q, 1H, 5-H, $^3J\{5\text{-H}, 12\text{-H}\} = 6.83$ Hz), 1.45-1.44 (d, 3H, 12-H, $^3J\{12\text{-H}, 5\text{-H}\} = 6.83$ Hz), 1.01 (s, 9H, 2-H, 3-H, 4-H).

7.6.6 N-PHENYL-N-(1-PHENYLETHYL)HYDROXYLAMIN (**16**)^[70]



15

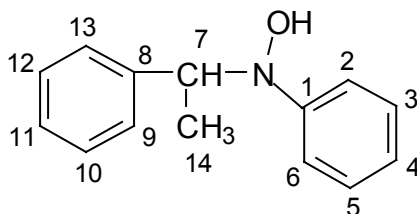
16

3 mL einer 1.60 M Lösung von Methyllithium in Diethylether (4.80 mmol) wurden auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und eine Lösung von 202 mg (1.02 mmol) α,N -Diphenylnitron (**15**) in 5.00 mL THF p.a. zugetropft. Die Temperatur wurde dabei unter $0\text{ }^\circ\text{C}$ gehalten. Anschließend wurde noch 30 Minuten gerührt, wobei die Temperatur auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ anstieg. Die Reaktionsmischung wurde mit 5 mL wässriger Ammoniumchlorid-Lösung (20 %) versetzt und weitere 10 Minuten gerührt, wobei sich überschüssiges Methyllithium unter starkem Aufschäumen zersetzte. Nach Abtrennung der organischen Phase wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand aus Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 65.5 mg (0.31 mmol) N-Phenyl-N-(1-phenylethyl)hydroxylamin (**16**), 30 %.

Schmelzpunkt: 70-72 °C (Lit.^[70]: 66-74 °C)

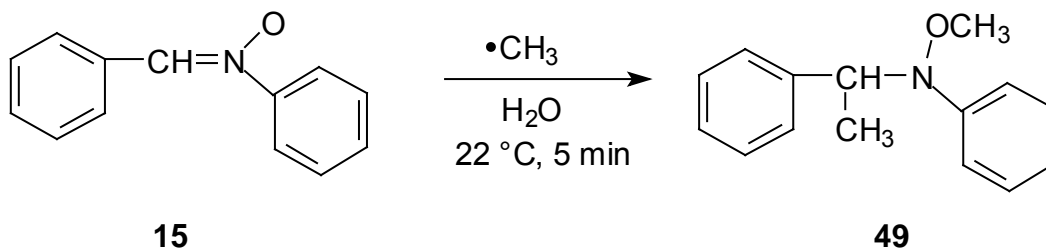
Charakterisierung:



16

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 7.41-7.39 (m, 2H, 9-H, 13-H, ⁴J{9/13-H, 11-H} = 1.38 Hz, ³J{9/13-H, 10/12-H} = 7.55 Hz), 7.25-7.22 (m, 2H, 10-H, 12-H, ³J{10/12-H, 11-H} = 7.15 Hz, ³J{10/12-H, 9/13-H} = 7.55 Hz), 7.20-7.17 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H), 7.14-7.12 (m, 2H, 2-H, 6-H), 6.87-6.84 (m, 1H, 11-H, ⁴J{11-H, 9/13-H} = 1.38 Hz, ³J{11-H, 10/12-H} = 7.15 Hz), 4.73-4.69 (q, 1H, 7-H, ³J{7-H, 14-H} = 6.83 Hz), 1.49-1.48 (d, 3H, 14-H, ³J{14-H, 7-H} = 6.83 Hz).

7.6.7 N-PHENYL-N-(1-PHENYLETHYL)METHOXYHYDROXYLAMIN

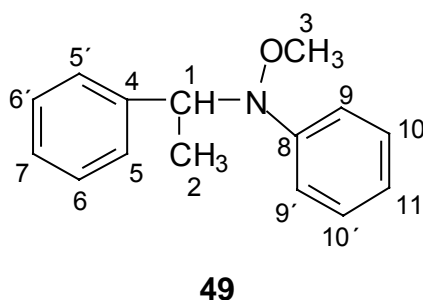


Die Bedingungen der entsprechenden UV/Vis-Messungen des Methylradikal-Abfangs durch Verbindung **15** (10 μ M Nitron **15** / 100 μ M FeCl₂ / 100 μ M H₂O₂, 1 % DMSO) wurden dem vorliegenden Versuch zugrunde gelegt:

20.0 mg (0.10 mmol) Nitron **15** wurden in 1.00 mL DMSO gelöst und in eine gelbe Lösung von 126.8 mg (1.00 mmol) Eisen(II)chlorid in 100 mL Wasser gegeben. Die Lösung wurde mit 102 μ M (1.00 mmol) 30proz. Wasserstoffperoxid versetzt und 5 Minuten bei 22 °C gerührt. Die Mischung wurde mit Chloroform (3 x 30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2 x 30 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (1 x 30 mL) gewaschen und eine halbe Stunde

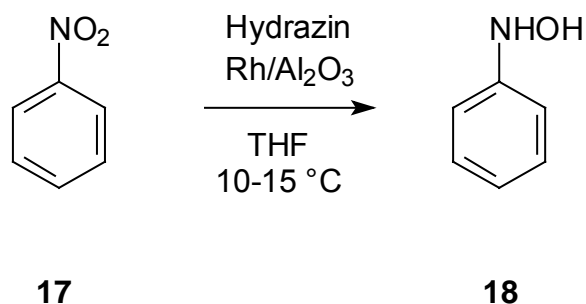
über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde ein gelbes Öl erhalten, welches im Ölpumpenvakuum getrocknet und anschließend mittels NMR-Spektroskopie untersucht wurde. Es zeigte sich, dass als Hauptprodukt dieser Radikalreaktion das O-Methyl-N-phenyl-N-(1-phenylethyl)-hydroxylamin (**49**) des Nitrons **15** entsteht. Das Nitron ist nach dieser Reaktion im NMR nicht mehr nachzuweisen.

Charakterisierung der Literatur-bekannten Verbindung:



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.41-7.39 (m, 3H, 10-H, 10'-H, 11-H), 7.32-7.24 (m, 4H, 6-H, 6'-H, 9-H, 9'-H), 7.11-7.09 (m, 2H, 5-H, 5'-H), 7.03-6.99 (m, 1H, 7-H), 4.56-4.52 (q, 1H, 1-H, ³J{1-H, 2-H} = 6.80 Hz), 3.38 (s, 3H, 3-H), 1.45-1.44 (d, 3H, 2-H, ³J{2-H, 1-H} = 6.80 Hz).

7.6.8 PHENYLHYDROXYLAMIN (**18**)



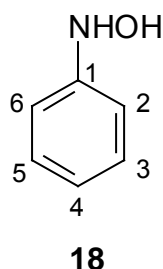
Zu einer Lösung von 12.5 mL (0.12 mol) Nitrobenzol (**17**) in 200 mL THF (p.a., sauerstofffrei) wurden 0.20 g Rhodium auf Aluminiumoxid (5 %) gegeben und anschließend innerhalb von 15 Minuten bei 10-15 °C 16.7 mL (0.22 mmol) Hydrazin-Hydrat zugetropft. Nach drei Stunden wurden weitere 2.28 mL (0.03 mmol) Hydrazin-Hydrat zugegeben und nach insgesamt 4.5 h bei 10-15 °C wurde die

Reaktionsmischung über Celite filtriert. Zu dem Filtrat wurde das gleiche Volumen Diethylether p.a. gegeben und die organische Phase mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Natriumsulfat wurde das Volumen am Rotationsverdampfer bis auf etwa 40.0 mL eingengt und zu dieser gelben, öligen Lösung bis zum Eintreten einer leichten Trübung n-Hexan p.a. zugesetzt (ca. 20.0 mL). Bei 4 °C fielen weiße, nadelförmige Kristalle der Verbindung **18** aus, welche über eine Fritte D2 abfiltriert und mit n-Hexan p.a. gewaschen wurden. Durch Zugabe von n-Hexan p.a. zur Mutterlauge konnte weiterer Feststoff isoliert werden. Die NMR-spektroskopische Untersuchung zeigte für alle Fraktionen eine Reinheit von >99 %.

Ausbeute: 7.20 g (0.07 mol) N-Phenylhydroxylamin (**18**), 58 %.

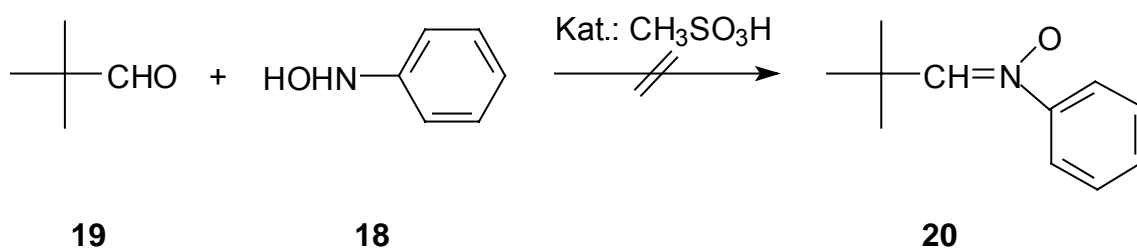
Schmelzpunkt: 81-83 °C (Lit.^[69]: 81 °C)

Charakterisierung:



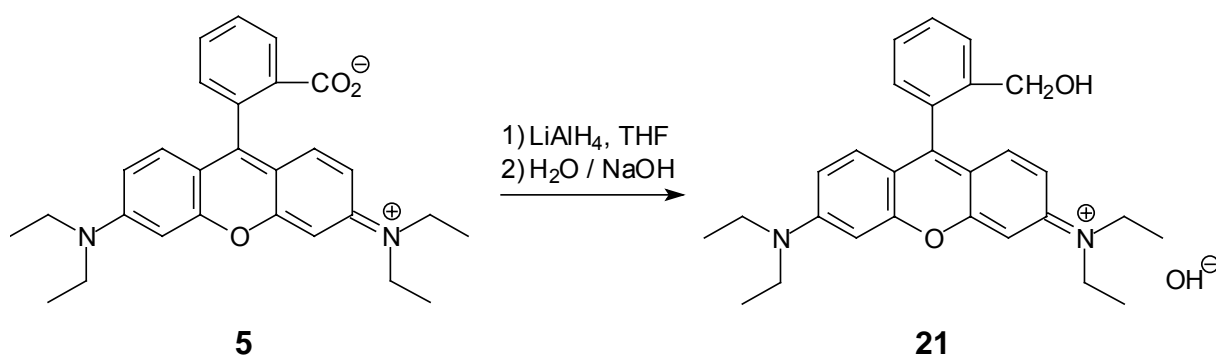
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.30-7.27 (m, 2H, 2-H, 6-H, ⁴J{2/6-H, 4-H} = 0.93 Hz, ³J{2/6-H, 3/5-H} = 7.45 Hz), 7.01-6.96 (m, 3H, 3-H, 4-H, 5-H, ³J{3/5-H, 4-H} = 7.75 Hz, ³J{3/5-H, 2/6-H} = 7.45 Hz, ⁴J{4-H, 2/6-H} = 0.93 Hz, ³J{4-H, 3/5-H} = 7.75 Hz), 5.30 (s (br), 1H, NH).

7.6.9 SYNTHESEVERSUCH VON N-PHENYL- α -TERT.-BUTYLNITRON



507 mg (4.65 mmol) N-Phenylhydroxylamin **19** und 517 μL (4.65 mmol) Pivalinaldehyd **18** wurden zusammen mit 100 mg Natriumsulfat in 10.0 mL THF p.a. bzw. mit 4.00 μL Methansulfonsäure in 10.0 mL Ethanol p.a. 2-3 Tage bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtausschluss gerührt. Diverse Versuche zur Umkristallisation in Ethanol, Diethylether und Cyclohexan brachten keinen Erfolg. Reinigungsversuche mittels Säulenchromatographie (Aluminiumoxid neutral, Toluol/Ethylacetat = 1/1) blieben ebenfalls erfolglos. Eine Umsetzung im NMR-Maßstab in deuteriertem Methanol zeigte, dass nicht identifizierte Nebenprodukte anfallen und dass das gewünschte Produkt in nicht zu isolierenden Mengen gebildet wird.

7.6.10 RHODAMIN B-ALKOHOL (**21**)

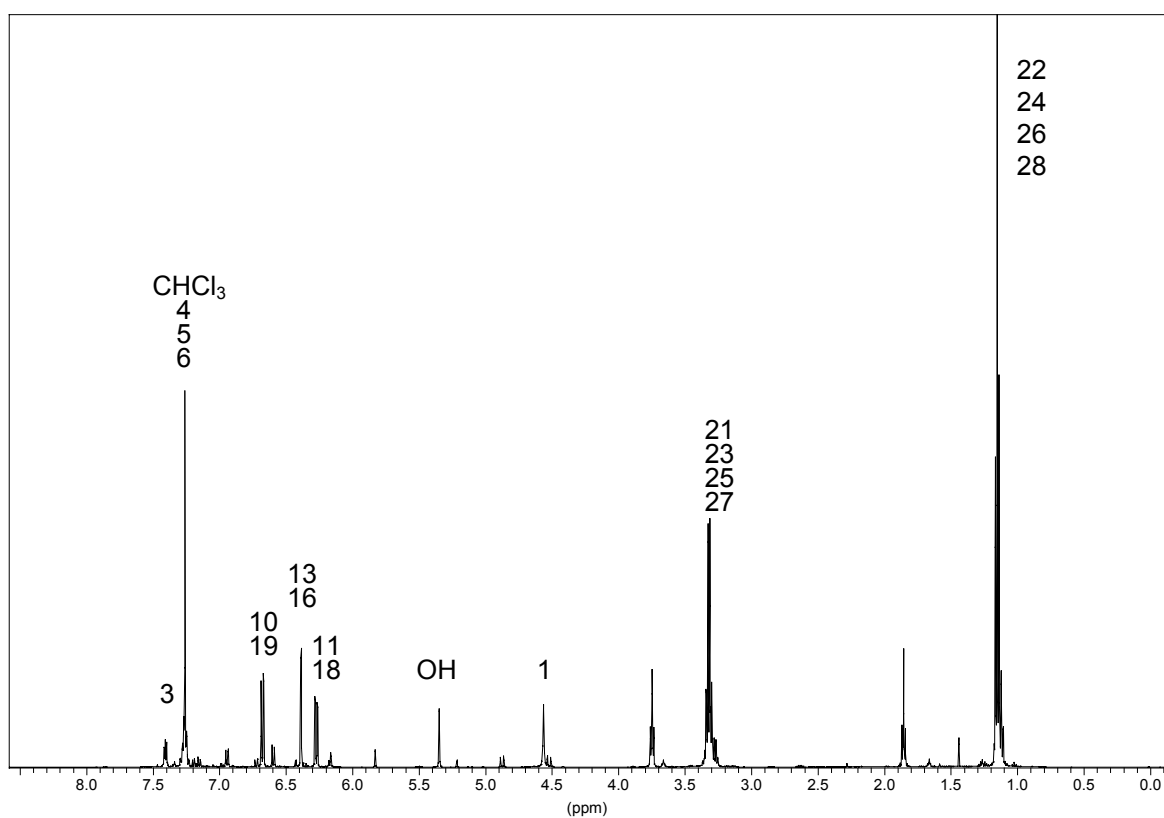
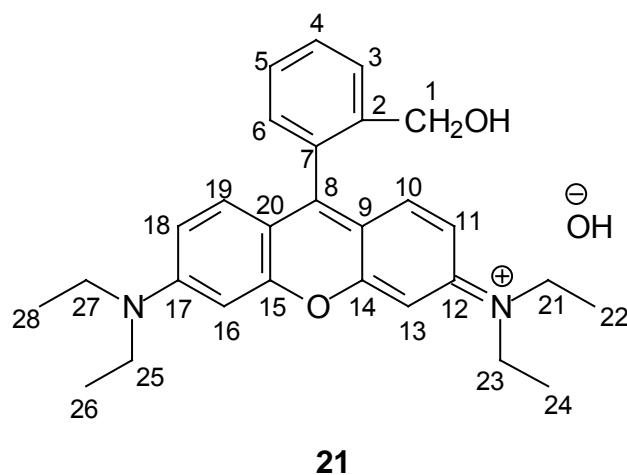


In einer ausgeheizten Reaktionsapparatur mit Tropftrichter, Schwanzhahn und Rückflusskühler mit Druckausgleich wurden unter Schutzgas 8.85 g (20.0 mmol) Verbindung **5** in 40.0 mL THF abs. vorgelegt und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Dazu wurde innerhalb von 10 Minuten eine Suspension von 0.75 g (20.0 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 15.0 mL THF abs. getropft und noch 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer weiteren Zugabe von 0.90 g (24.0 mmol) LiAlH_4 in 15.0 mL THF abs. wurde nochmals über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, anschließend tropfenweise 3.00 mL Wasser, 3.00 mL Natronlauge (15 %) und 6.00 mL Wasser zugegeben und noch 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde über einen Faltenfilter filtriert und das Filtrat über Kaliumcarbonat getrocknet. Das Trockenmittel wurde abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Ausbeute: 8.68 g (19.3 mmol) Rhodamin B-Alkohol (**21**), 97 %

Schmelzpunkt: 116-118 °C

Charakterisierung:

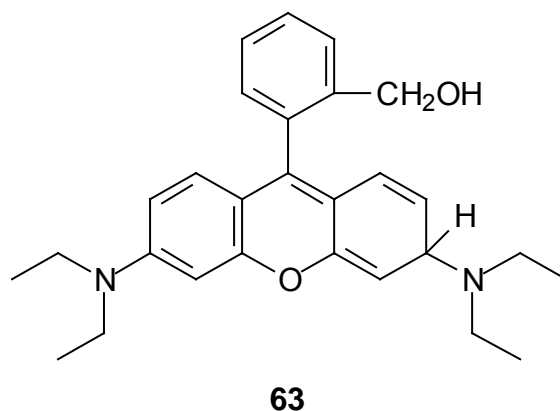


¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.10-1.16 (t, 12H, 22-H, 24-H, 26-H, 28-H, ³J{22-H, 21-H} = 7.15 Hz, ³J{24-H, 23-H} = 7.15 Hz, ³J{26-H, 25-H} = 7.15 Hz, ³J{28-H, 27-H} = 7.15 Hz), 3.30-3.34 (q, 8H, 21-H, 23-H, 25-H, 27-H, ³J{21-H,

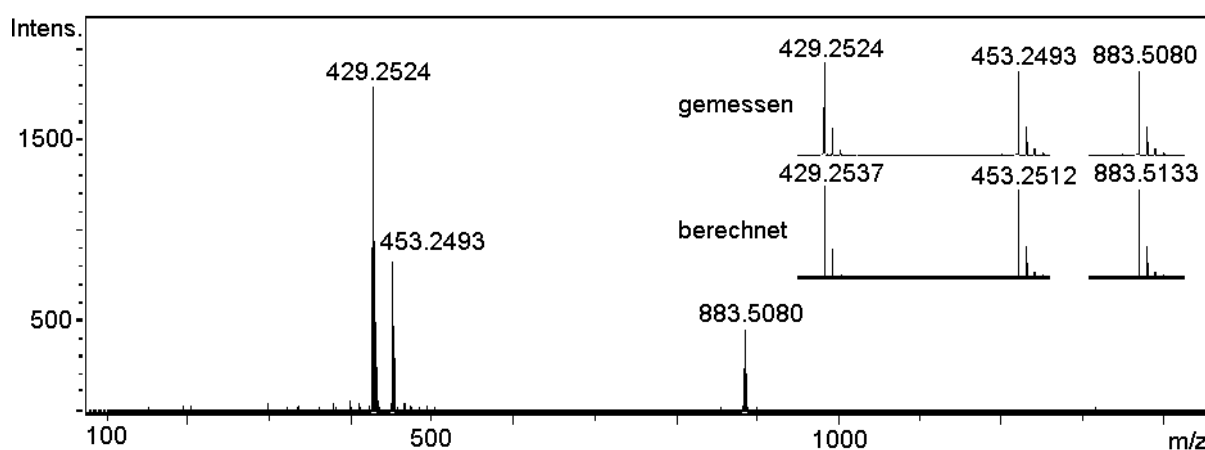
22-H} = 7.15 Hz, $^3J\{23\text{-H}, 24\text{-H}\} = 7.15$ Hz, $^3J\{25\text{-H}, 26\text{-H}\} = 7.15$ Hz, $^3J\{27\text{-H}, 28\text{-H}\} = 7.15$ Hz), 4.56 (s, 2H, 1-H), 5.35 (s, 1H, OH), 6.26-6.28 (dd, 2H, 11-H, 18-H, $^3J\{11\text{-H}, 10\text{-H}\} = 8.60$ Hz, $^3J\{18\text{-H}, 19\text{-H}\} = 8.60$ Hz, $^4J\{11\text{-H}, 13\text{-H}\} = 2.60$ Hz, $^4J\{18\text{-H}, 16\text{-H}\} = 2.60$ Hz), 6.38-6.39 (d, 2H, 13-H, 16-H, $^4J\{13\text{-H}, 11\text{-H}\} = 2.60$ Hz, $^4J\{16\text{-H}, 18\text{-H}\} = 2.60$ Hz), 6.67-6.69 (d, 2H, 10-H, 19-H, $^3J\{10\text{-H}, 11\text{-H}\} = 8.60$ Hz, $^3J\{19\text{-H}, 18\text{-H}\} = 8.60$ Hz), 7.24-7.26 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H), 7.40-7.41 (m, 1H, 3-H).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.74 (22-C, 24-C, 26-C, 28-C), 44.50 (21-C, 23-C, 25-C, 27-C), 68.10 (1-C), 98.90 (13-C, 16-C), 107.54 (11-C, 18-C), 111.54 (9-C, 20-C), 127.03 (5-C), 128.11 (4-C), 129.69 (3-C), 130.05 (10-C, 19-C), 130.36 (6-C), 131.52 (7-C), 138.72 (14-C, 15-C), 146.54 (2-C), 147.90 (12-C, 17-C), 151.77 (8-C).

Bei der Reduktion wurde teilweise auch die C=N-Doppelbindung hydriert (**21/63** = 5/1). Zur selektiven Reduktion der Carboxylgruppe hätte Diisobutylaluminiumhydrid verwendet werden müssen, da dieses die Iminium-Gruppe im Gegensatz zum Lithiumaluminiumhydrid nicht angreift. Da im darauffolgenden Reaktionsschritt jedoch eine Oxidation zum Aldehyd **22** mit Pyridiniumchlorochromat erfolgen sollte, war eine Abtrennung des Nebenproduktes **63** nicht erforderlich, da es ebenfalls – wie auch der Alkohol **21** – zum Aldehyd **22** oxidiert wird.



HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

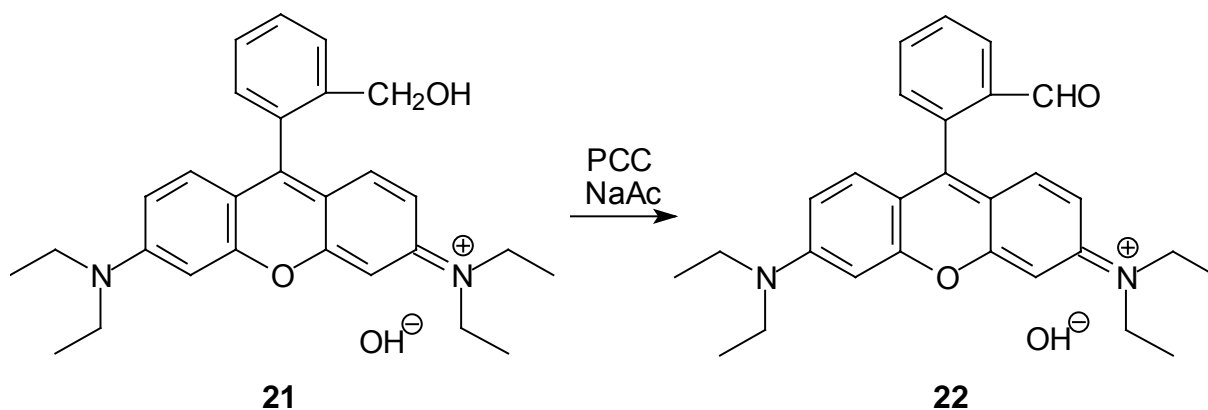


berechnet (für C₂₈H₃₃N₂O₂) : 429.2537 [M⁺ (21)] (Iminiumion)
 gefunden : 429.2524
 Abweichung : 3.00 ppm

berechnet (für C₂₈H₃₄N₂O₂Na) : 453.2512 [M (63) + Na⁺]
 gefunden : 453.2493
 Abweichung : 4.00 ppm

berechnet (für C₅₆H₆₈N₄O₄Na) : 883.5133 [2M (63) + Na⁺]
 gefunden : 883.5080
 Abweichung : 6.00 ppm

7.6.11 RHODAMIN B-ALDEHYD (22)



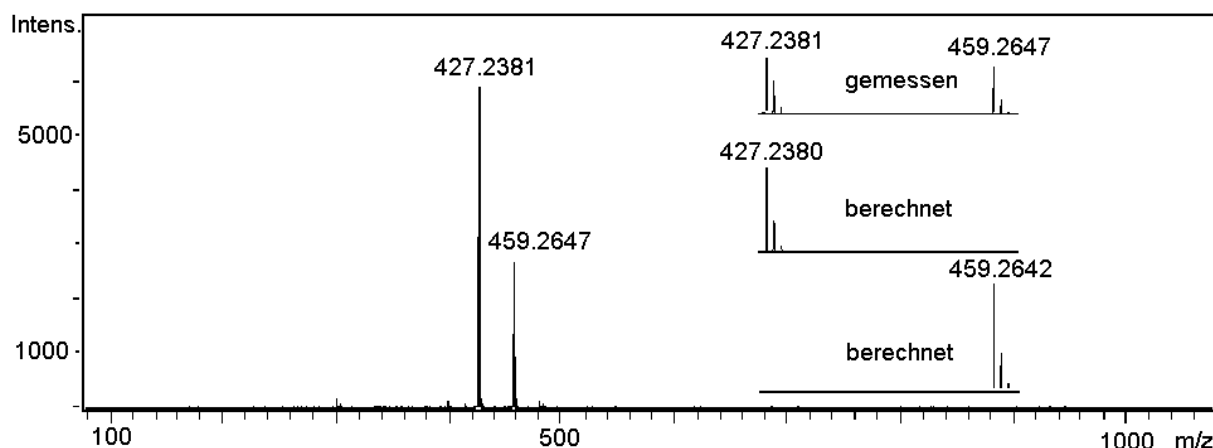
1.00 g Verbindung **21** (2.24 mmol) wurde in 15.0 mL Dichlormethan p.a. in einem 100 mL-Dreihalskolben mit Schwanzhahn und Druckausgleich unter Argon gelöst. Dazu wurden 36.1 mg (0.44 mmol) Natriumacetat (wasserfrei) und portionsweise 1.60 g (7.42 mmol) Pyridiniumchlorochromat gegeben und vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die rotschwarze Aufschlämmung wurde mit 30.0 mL THF abs. versetzt und über eine Fritte (D3) mit Florisil (60-100 mesh, 15 cm Füllhöhe, d = 3 cm) filtriert und mit 100 mL THF nachgewaschen. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 89 %. Da sowohl das Edukt als auch das Produkt sehr gut ionisierbar sind, konnte im ESI-TOF eine vollständige Umsetzung von Verbindung **21** zu Verbindung **22** beobachtet werden. Allerdings gelang es weder durch Umkristallisation noch durch Säulenchromatographie, das empfindliche Aldehyd **22** vollständig zu reinigen. Daher wurde an dieser Stelle auf eine Reinigung verzichtet und die Umsetzung zum Nitron mit dem Rohprodukt durchgeführt.

Ausbeute: 852 mg (1.99 mmol) Rhodamin B-Aldehyd (**22**), 89 %.

Schmelzpunkt: 200 °C (Zersetzung)

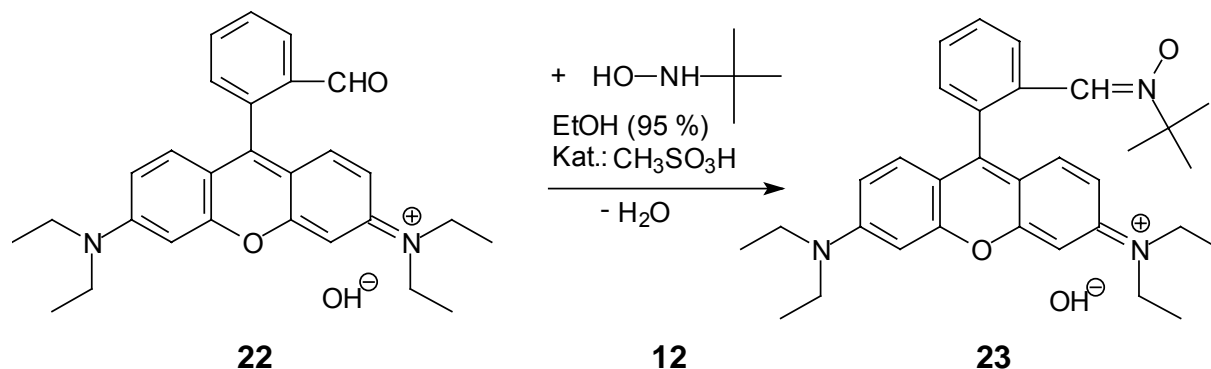
Charakterisierung:

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):



berechnet (für C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₂)	: 427.2380	[M ⁺ (22)]
gefunden	: 427.2381	
Abweichung	: 0.23 ppm	

berechnet (für $C_{28}H_{31}N_2O_2 \times MeOH$)	: 459.2642	[M (22) + Methanol]
gefunden	: 459.2647	
Abweichung	: 1.09 ppm	

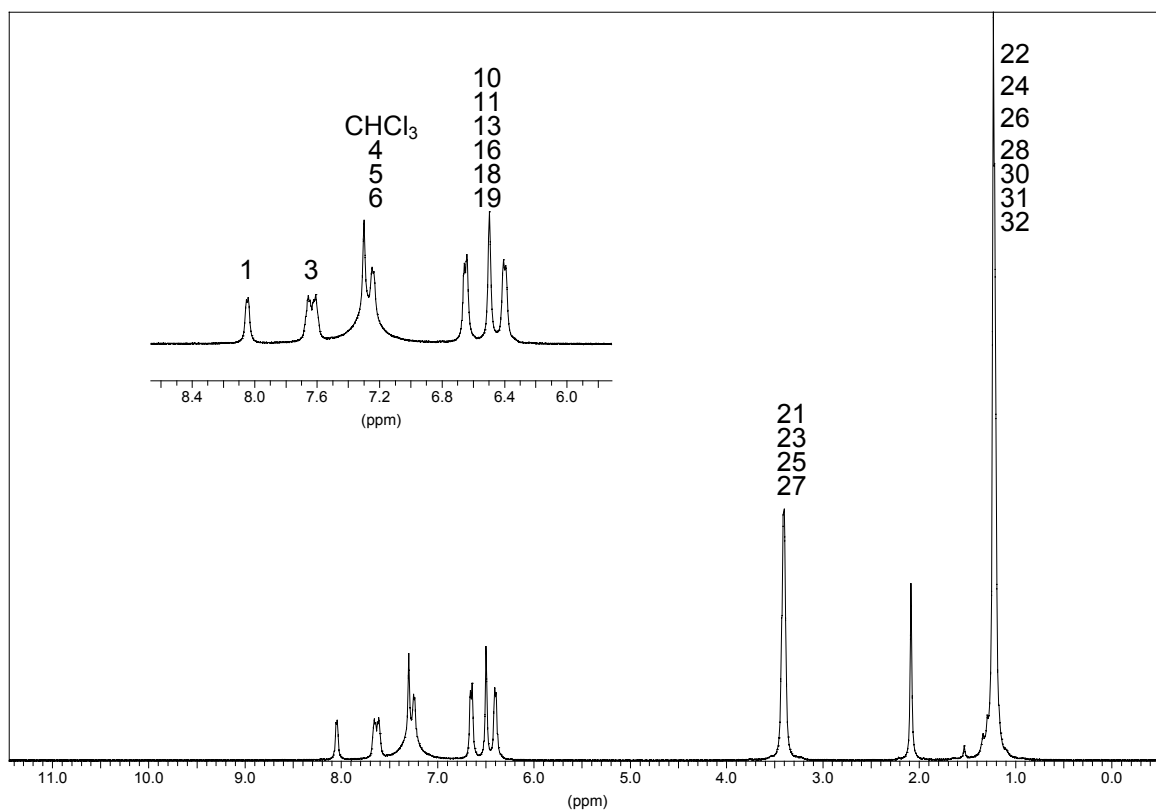
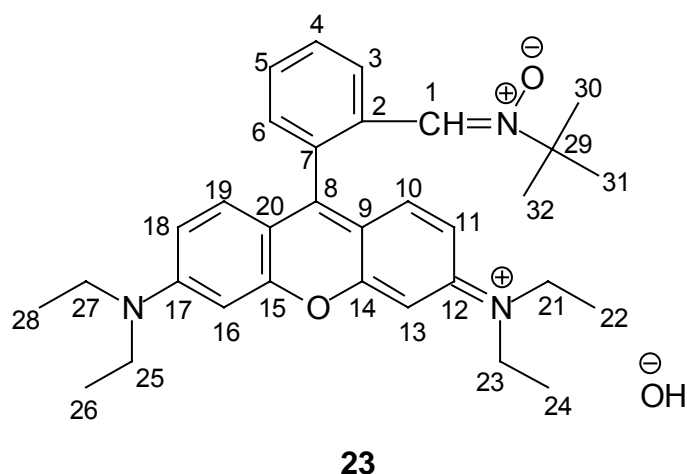
7.6.12 *tert.*-BUTYLNITRONO-RHODAMIN B (**23**)

590 mg Verbindung **22** (1.33 mmol) wurde in 120 mL Ethanol p.a. gelöst. Dazu wurde eine Lösung von 386 mg (2.59 mmol) *N*-*tert.*-Butylhydroxylaminacetat (**12**) in 5.00 mL Ethanol p.a. gegeben und nach Zugabe von 1.30 μ L Methansulfonsäure fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch an deaktiviertem neutralem Aluminiumoxid (10 % Wasser) unter Verwendung des Lösungsmittelgemisches Toluol/Ethanol (2:1 v/v, R_f (**23**) = 0.9) gereinigt.

Ausbeute: 542 mg (1.05 mmol) *tert.*-Butylnitrono-rhodamin B (**23**), 29 %.

Schmelzpunkt: 210 °C (Zersetzung)

Charakterisierung:

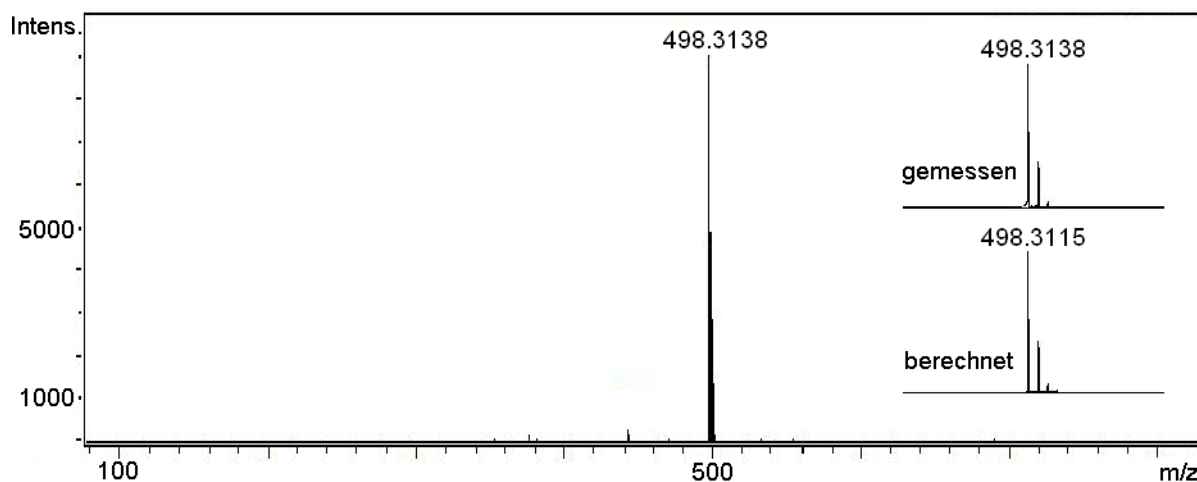


¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.23 (m, 21H, 22-H, 24-H, 26-H, 28-H, 30-H, 31-H, 32-H), 3.40-3.41 (m, 8H, 21-H, 23-H, 25-H, 27-H), 6.39-6.66 (m, 6H, 10-H, 11-H, 13-H, 16-H, 18-H, 19-H), 7.24-7.30 (m, 3H, 4-H, 5-H, 6-H, CDCl₃), 7.61-7.66 (m, 1H, 3-H), 8.04 (s, 1H, 1-H), 2.08 (Aceton).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.70 (22-C, 24-C, 26-C, 28-C), 21.78 (29-C), 25.09 (30-C, 31-C, 32-C), 44.71 (21-C, 23-C, 25-C, 27-C), 56.87 (13-C, 16-C), 97.63

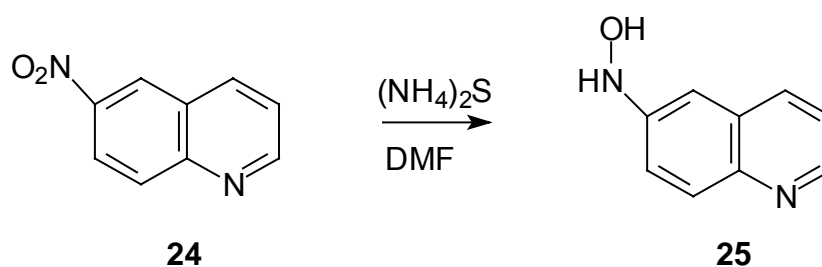
(9-C, 20-C), 106.72 (6-C), 108.55 (11-C, 18-C), 124.63 (4-C), 125.33 (10-C, 19-C), 128.93 (8-C), 129.35 (3-C), 134.14 (5-C), 150.05 (2-C), 151.66 (14-C, 15-C), 153.83 (12-C, 17-C), 170.15 (7-C), 177.48 (1-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):



berechnet (für $C_{32}H_{40}N_3O_2$)	: 498.3115	$[M^+ (23)]$
gefunden	: 498.3138	
Abweichung	: 5.00 ppm	

7.6.13 4-HYDROXYLAMINOCHINOLIN (25)



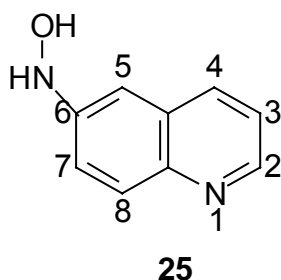
Zur Lösung von 3.39 g (19.1 mmol) der Nitroverbindung **24** in 140 mL DMF wurde bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Argon tropfenweise innerhalb von 80 Minuten 140 mL wässrige Ammoniumsulfid-Lösung (21 %) gegeben. Die Lösung wurde 2 h bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Chloroform/Methanol = 25 : 1) verfolgt. Zur Reaktionsmischung wurden 120 mL Wasser ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) gegeben und mit Diethylether ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) (je 100 mL, insgesamt 1.60 L) extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden mit Eiswasser (3 x 150 mL) im Argonstrom

gewaschen und über Natriumsulfat bei 0 °C getrocknet. Die etherische Lösung wurde am Rotationsverdampfer (30 °C, 675 hPa) bis auf 350 mL eingengt und mit Eiswasser (3 x 50 mL) gewaschen. Anschließend wurde die etherische Lösung erneut am Rotationsverdampfer (30 °C, 675 hPa) bis auf 170 mL eingengt und bei 0 °C über Natriumsulfat 90 Minuten getrocknet. Zu der etherischen Lösung (ca. 200 mL) wurden 600 mL n-Hexan gegeben und über Nacht im Gefrierschrank aufbewahrt. Der ausgefallene hellgelbe Feststoff wurde unter Argon abfiltriert (D4) und über Paraffin mittels Ölpumpenvakuum 30 Minuten getrocknet. Das NMR-Spektrum zeigte, dass das Produkt 88 % der Verbindung **25** und 12 % des entsprechenden Amins enthält.

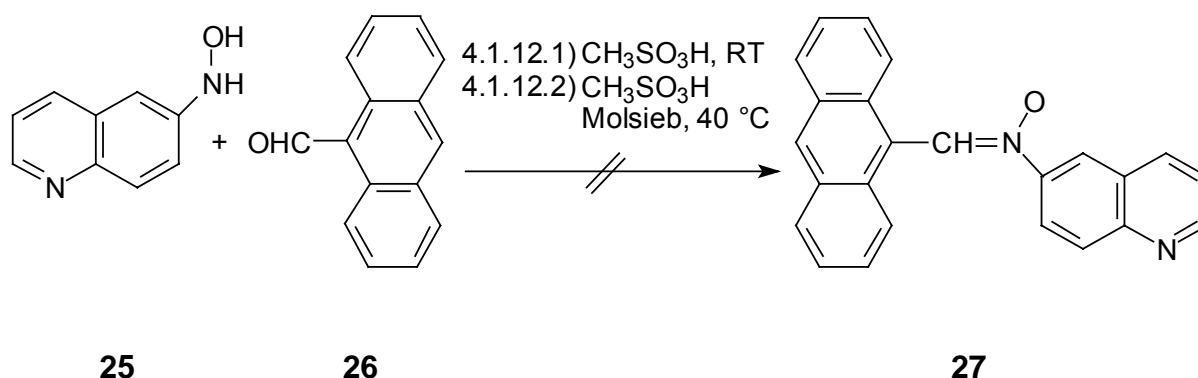
Ausbeute: 0.53 g (2.76 mmol) 4-Hydroxylaminochinolin **25**, 15 %.

Schmelzpunkt: 208 °C (Lit.^[88]: 212 °C)

Charakterisierung:



¹H-NMR (500 MHz, DMSO): δ [ppm] = 7.20-7.23 (dd, 1H, 7-H, $^4J\{7\text{-H}, 5\text{-H}\} = 2.30$ Hz, $^3J\{7\text{-H}, 8\text{-H}\} = 9.05$ Hz), 7.24-7.26 (dd, 1H, 3-H, $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 4.20$ Hz, $^3J\{3\text{-H}, 4\text{-H}\} = 8.30$ Hz), 7.27-7.28 (d, 1H, 5-H, $^4J\{5\text{-H}, 7\text{-H}\} = 2.30$ Hz), 7.82-7.84 (d, 1H, 8-H, $^3J\{8\text{-H}, 7\text{-H}\} = 9.05$ Hz), 7.98 (b, 1H, 4-H, $^3J\{4\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.30$ Hz, $^4J\{4\text{-H}, 2\text{-H}\} = 1.68$ Hz), 8.00 (b, 1H, OH), 8.02 (d, 1H, NH), 8.58-8.59 (dd, 1H, 2-H, $^4J\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 4.20$ Hz, $^4J\{2\text{-H}, 4\text{-H}\} = 1.68$ Hz).

7.6.14 SYNTHESEVERSUCH VON N-(4-CHINOLINYL)- α -(9-ANTHRACENYL)-NITRON (**27**)

7.6.14.1 Syntheseversuch bei 20 °C

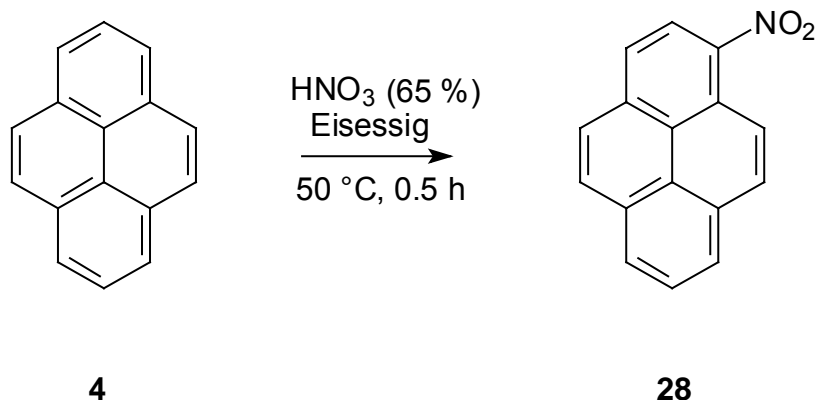
Zur Lösung von 94.0 mg (0.45 mmol) des Aldehyds **26** in 40.0 mL Ethanol p.a. wurden 90.3 mg (0.45 mmol) des Hydroxylamins **25**, gelöst in 10 mL Ethanol p.a., gegeben. Nach Zugabe von 0.45 μL (0.01 mmol) Methansulfonsäure wurde die gelbe Lösung 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt, wobei die Reaktion mit Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Chloroform/Methanol = 25:2) verfolgt wurde. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden diverse Versuche zur Umkristallisation unternommen, die jedoch fehlschlagen. Daneben wurde auch eine Auftrennung der Substanzen mittels Säulenchromatographie durchgeführt, wobei mittels NMR-Spektroskopie und ESI-TOF festgestellt wurde, dass das einzige Produkt der Umsetzung die Azoxyverbindung ($R_f(\text{SiO}_2, \text{CHCl}_3/\text{MeOH}25/2) = 0.70$; ESI-TOF: $[\text{Azoxy} + \text{H}^+] = 301 \text{ m/z}$) des Hydroxylamins **25** ist. Das 9-Anthracenaldehyd ($R_f = 0.79$) hat dagegen nicht reagiert und konnte wieder rein zurück gewonnen werden.

7.6.14.2 Syntheseversuch bei 40 °C

Zur Lösung von 94.1 mg (0.45 mmol) des Aldehyds **26** in 40 mL Ethanol (abs.) wurde eine Lösung von 90.1 mg (0.45 mmol) Hydroxylamin **25** in 10 mL Ethanol (abs.) sowie 0.45 μL (0.01 mmol) Methansulfonsäure gegeben. Die Reaktion fand über Molsieb 4 Å bei 40 °C statt und wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel, Chloroform/Methanol = 25:2) verfolgt. Dabei wurde deutlich, dass lediglich nach 3.5 h die Azoxyverbindung ($R_f = 0.70$) entsteht, jedoch auch nach 8 Tagen noch kein anderes Produkt entstanden war. Das Aldehyd **26** ($R_f = 0.79$) liegt

unverändert vor. Die Azoxyverbindung wurde mittels NMR-Spektroskopie und ESI-TOF identifiziert [$\text{Azoxy} + \text{H}^+$] = 301 m/z).

7.6.15 1-NITROPYREN (**28**)^[89]

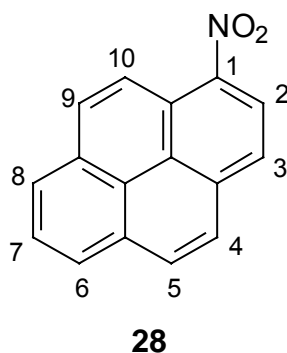


In einem 2L-Kolben mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Rückflusskühler wurden 100 g Pyren (**4**) (0.49 mmol) in 800 mL Eisessig in der Siedehitze gelöst. Nach Abkühlung auf 50 °C fiel ein Teil des Pyrens wieder feinkristallin aus. Bei 50 °C wurde eine Mischung aus 50.0 mL Eisessig und 42.0 mL Salpetersäure (65 %) zugetropft und anschließend eine halbe Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Nach Erkalten wurde das Produkt abfiltriert (D3), mit Eisessig (2x50 mL) gewaschen und anschließend mit Wasser neutral gewaschen. Die Trocknung des Rohproduktes erfolgte im Vakuumexsikkator über Silikagel. 118 g des erhaltenen Rohproduktes wurden in 1.90 L Eisessig umkristallisiert. Die ausgefallenen gelben, nadelnformigen Kristalle wurden abfiltriert und mit Wasser neutral gewaschen. Die Trocknung erfolgte im Vakuumexsikkator über Silikagel.

Ausbeute: 114 g (0.46 mol) 1-Nitropyren (**28**), 96 %.

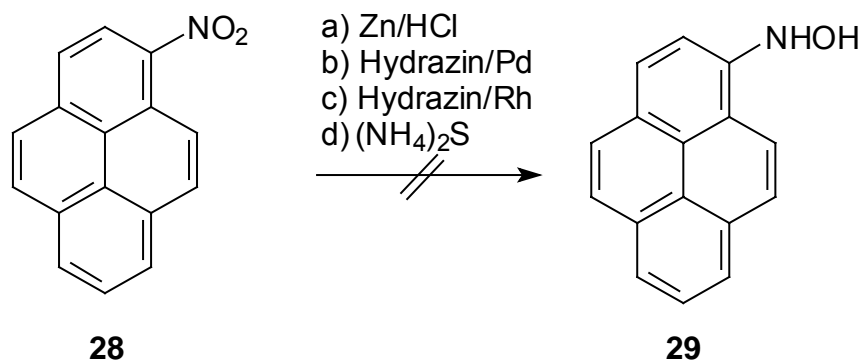
Schmelzpunkt: 153 °C (Lit.^[89]: 153-155 °C)

Charakterisierung:



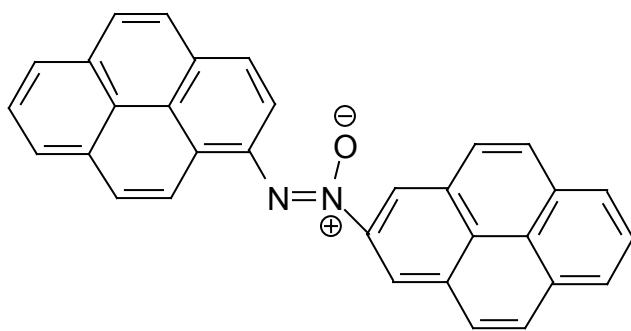
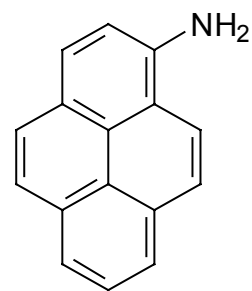
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.83-8.85 (d, 1H, 2-H, $^3J\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 9.50$ Hz), 8.62-8.63 (d, 1H, 10-H, $^3J\{10\text{-H}, 9\text{-H}\} = 8.50$ Hz), 8.25-8.30 (m, 3H, 3-H, 7-H, 9-H), 8.19-8.20 (d, 1H, 4-H, $^3J\{4\text{-H}, 5\text{-H}\} = 8.85$ Hz), 8.08-8.11 (m, 2H, 6-H, 8-H), 8.03-8.05 (d, 1H, 5-H, $^3J\{5\text{-H}, 4\text{-H}\} = 8.85$ Hz).

7.6.16 SYNTHESEVERSUCH VON 1-HYDROXYLAMINOPYREN (**29**)



7.6.16.1 Syntheseversuch a) Reduktionsmittel Zn/HCl ^[74]

Unter Argon wurden 2.00 g (7.85 mmol) Nitropyren (**28**) in 80 mL Diethylether (p.a., sauerstofffrei) suspendiert und 3.00 g (45.9 mmol) Zinkstaub sowie 1 mL einer wässrigen Ammoniumchlorid-Lösung (25 %)/konz. Ammoniak-Lösung (2/1 v/v) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei einer Temperatur von 22 °C und 0 °C 30 Minuten bzw. bei tiefer Temperatur vier Stunden gerührt und mittels Dünnschichtchromatographie (Hexan/Chloroform = 2/1) verfolgt. Es zeigte sich, dass neben geringen Mengen des gewünschten Hydroxylamins (**29**) ($R_f = 0.69$) hauptsächlich das entsprechende Aminopyren **65** ($R_f = 0.05$) sowie die Azoxyverbindung **64** ($R_f = 0.16$) entstehen, was mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurde.

**64**^[74]**65**^[74]

Zur Isolierung wurde die Suspension über eine Fritte (D3) in Hexan (p.a., 4 °C, sauerstofffrei) filtriert und etwa 50 mL Diethylether abkondensiert. Der dabei ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert (Fritte, D3) und über Paraffin im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die ESI-TOF-MS sowie NMR-spektroskopische Untersuchung ließ jedoch keine isolierbare Menge an 1-Hydroxylaminopyren (**29**) erkennen.

7.6.16.2 Syntheseversuch b) Reduktionsmittel Hydrazin/Pd

500 mg (1.96 mmol) 1-Nitropyren (**28**) wurden in 15 mL THF (p.a., sauerstofffrei) unter Schutzgas gelöst und 5.00 mg Palladium auf Aktivkohle (5 %) zugesetzt. Aus der Pipette wurden 100 μ L (2.08 mmol) Hydrazin-Hydrat zugetropft und die Reaktionsmischung bei einer Temperatur von 22 °C und 0 °C 30 Minuten bzw. bei tiefer Temperatur vier Stunden gerührt und mittels Dünnschichtchromatographie (Hexan/Chloroform = 2/1) verfolgt. Hierbei entstand das entsprechende Aminopyren **65** (R_f = 0.05) sowie die Azoxyverbindung **64** (R_f = 0.16). Daneben ist das Edukt **28** (R_f = 0.33) zu erkennen, jedoch nicht das gewünschte Hydroxylamin (**29**) (R_f = 0.69).

7.6.16.3 Syntheseversuch c) Reduktionsmittel Hydrazin/Rh

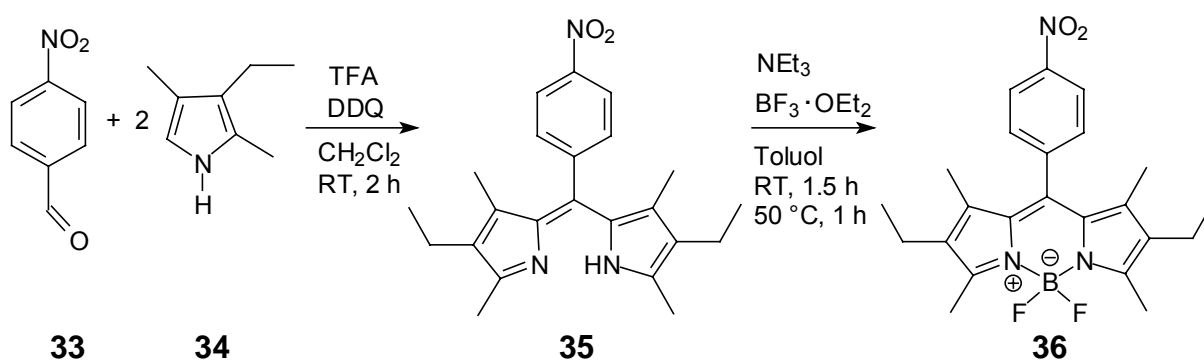
Zur Lösung von 15.0 g (0.06 mol) 1-Nitropyren (**28**) in 100 mL THF (p.a., sauerstofffrei) wurden unter Rühren bei 22 °C und bei 0 °C 100 mg Rhodium auf Aluminiumoxid gegeben und 8.35 mL (0.17 mol) Hydrazin-Hydrat zugetropft und die Reaktionsmischung bei einer Temperatur von 22 °C und 0 °C 4.5 h bzw. bei tiefer Temperatur 8 h gerührt und mittels Dünnschichtchromatographie (Hexan / Chloroform = 2/1) verfolgt. Auch hierbei war das entsprechende Aminopyren **65** (R_f = 0.05) sowie die Azoxyverbindung **64** (R_f = 0.16) neben noch nicht umgesetztem

Edukt **28** ($R_f = 0.33$) zu erkennen, jedoch nicht das gewünschte Hydroxylamin (**29**) ($R_f = 0.69$).

7.6.16.4 Syntheseversuch d) Reduktionsmittel Ammoniumsulfid

2.50 g (9.81 mmol) 1-Nitropyren (**28**) wurden in 190 mL Dimethylsulfoxid (p.a., sauerstofffrei) gelöst und durch ein Eis/Kochsalz-Bad auf 0 °C abgekühlt. Innerhalb von 45 Minuten wurden 130 mL wässrige Ammoniumsulfidlösung (21 %) zugetropft, wobei die Temperatur zwischen –2 °C und 5 °C gehalten wurde. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Hexan / Chloroform = 2/1). Auch hier zeigte sich, dass sich neben geringen Mengen des gewünschten Hydroxylamins (**29**) ($R_f = 0.69$) hauptsächlich das entsprechende Aminopyren **65** ($R_f = 0.05$) sowie die Azoxyverbindung **64** ($R_f = 0.16$) gebildet haben. Die Reaktionsmischung wurde 24 h im Eis/Kochsalz-Bad belassen, wobei sie sich langsam auf 22 °C erwärmte. Es wurden jeweils 200 mL Wasser (4 °C, sauerstofffrei) und Diethylether p.a. (4 °C, sauerstofffrei) zugegeben und die Lösung mit Diethylether p.a. (4 °C, sauerstofffrei) unter Schutzgas extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (4 °C, sauerstofffrei) unter Schutzgas gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abkondensation des Lösungsmittels wurde der zurückgebliebene Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet. Auch hier ließ die ESI-TOF-MS sowie NMR-spektroskopische Untersuchung keine isolierbare Menge an 1-Hydroxylaminopyren (**29**) erkennen.

7.6.17 4,4-DIFLUORO-8-(4-NITROPHENYL)1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**36**)^[90]

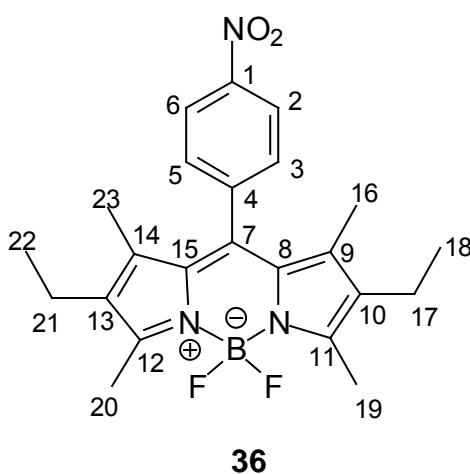


1.96 g (13.0 mmol) 4-Nitrobenzaldehyd (**33**) wurden im 1L-Stickstoffkolben unter Schutzgas in 500 mL Dichlormethan (p.a., sauerstofffrei) gelöst und 3.51 mL (26.0 mmol) Pyrrol **34** zugegeben. Anschließend wurden 100 μ L TFA zugesetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde mit gesättigter, wässriger NaHCO_3 -Lösung (3 x 40 mL), Wasser (3 x 40 mL) und gesättigter, wässriger NaCl-Lösung (3 x 40 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde in 50.0 mL Toluol (abs.) gelöst und eine Lösung von 2.41 g Dichlordicyano-*p*-benzochinon (DDQ) in 100 mL Toluol (abs.) innerhalb von ca. 10 Minuten zugetropft. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurden 4.40 mL Triethylamin zur schwarzen Mischung und nach weiteren 10 Minuten 6.70 mL Bortrifluorid-Etherat zugegeben, 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 1 Stunde bei 50 °C gerührt. Nach Abkühlung wurde die Mischung über eine kurze Säule filtriert (Kieselgel/Toluol). Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte säulenchromatographisch auf Kieselgel mit Dichlormethan/ Cyclohexan = 3:2 (v/v). $R_f(36)$ ($\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) = 0.7 (Lit.: 0.4)^[90].

Ausbeute: 1.94 g (4.55 mmol) Nitro-BODIPY **36**, 35 %.

Schmelzpunkt: 196 °C (Lit.^[90]: 193.5 – 196 °C)

Charakterisierung:



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.39-8.37 (d, 2H, 2-H, 6-H, ³J{2-H, 3-H} = 8.70 Hz, ³J{6-H, 5-H} = 8.70 Hz), 7.54-7.53 (d, 2H, 3-H, 5-H, ³J{3-H, 2-H} = 8.70 Hz, ³J{5-H, 6-H} = 8.70 Hz), 2.54 (s, 6H, 19-H, 20-H), 2.33-2.28 (q, 4H, 17-H, 21-H, ³J{17-H, 18-H} = 7.60 Hz, ³J{21-H, 22-H} = 7.60 Hz), 1.26 (s, 6H, 16-H, 23-H), 1.00-0.97 (t, 6H, 18-H, 22-H, ³J{18-H, 17-H} = 7.60 Hz, ³J{22-H, 21-H} = 7.60 Hz).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

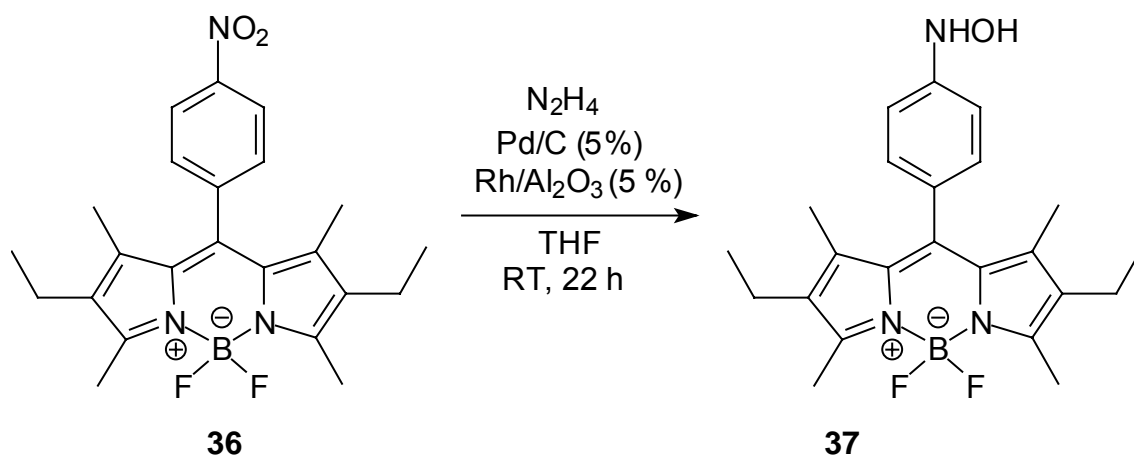
berechnet (für C ₂₃ H ₂₈ BF ₂ N ₃ ONa)	: 448.1983	[M + Na]
gefunden	: 448.1998	
Abweichung	: 3.30 ppm	

berechnet (für C ₂₃ H ₂₉ BF ₂ N ₃ O)	: 426.2163	[M + H]
gefunden	: 426.2176	
Abweichung	: 3.10 ppm	

berechnet (für C ₂₃ H ₂₉ BF ₂ N ₃ O)	: 406.2101	[M + H] - HF
gefunden	: 406.2110	
Abweichung	: 2.20 ppm	

UV/Vis-Messung: log ε = 4.91 (λ_{max} = 533 nm), 10 μM in Chloroform.

7.6.18 4,4-DIFLUORO-8-(4-HYDROXYLAMINOPHENYL)1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**37**)

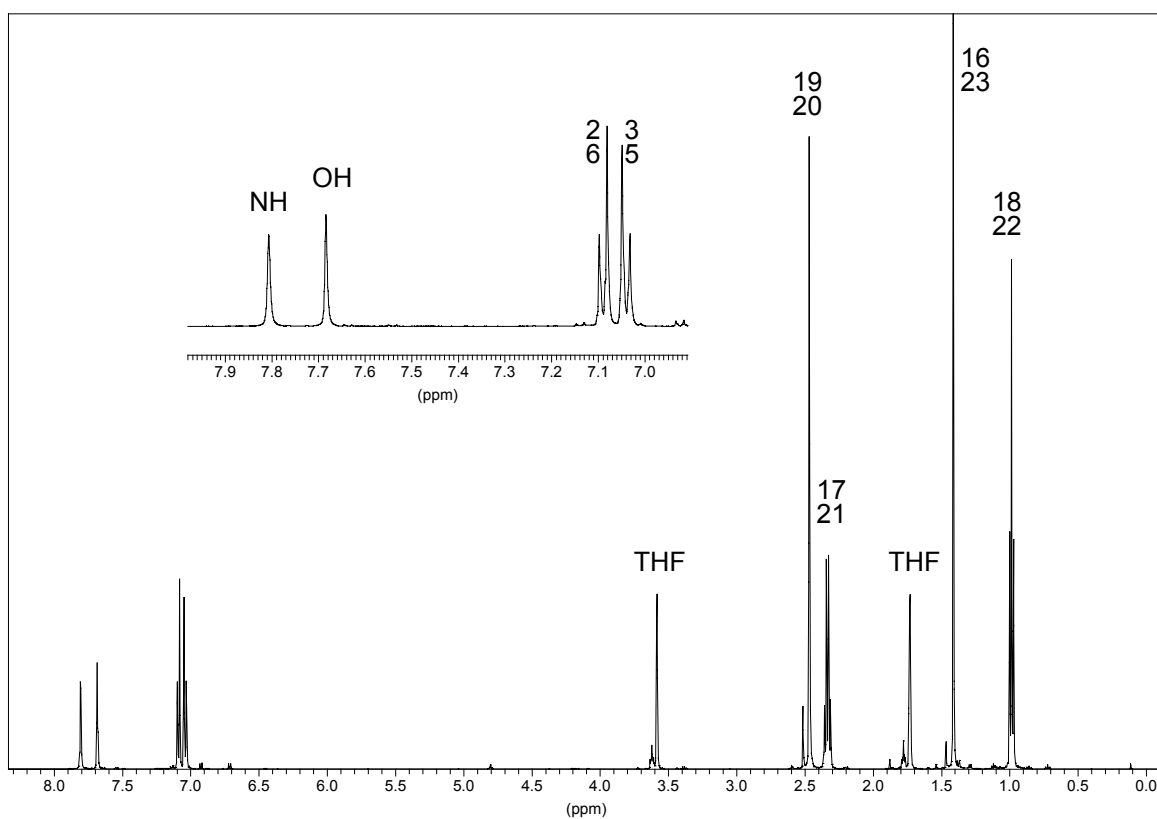
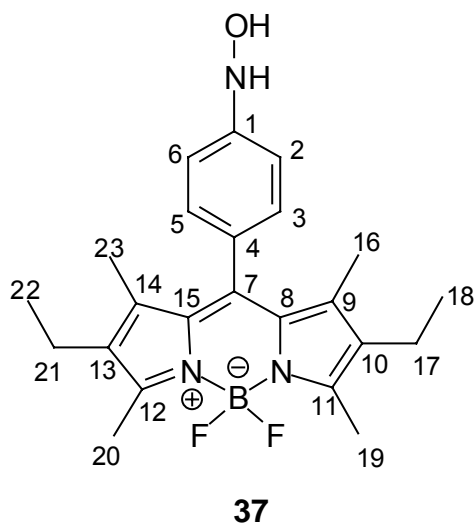


In einem 25 mL Dreihalsrundkolben mit Stickstoffhahn, Rückflusskühler und Tropftrichter wurden 1.00 g (2.35 mmol) Nitro-BODIPY **36** in 14 mL THF (p.a., sauerstofffrei) unter Argon gelöst und mit 17.1 mg Palladium auf Aktivkohle (5 %) und 17.1 mg Rhodium auf Aluminiumoxid (5 %) versetzt und gerührt (der Einsatz eines 1/1-Gemisches beider Katalysatoren führte zu einer verbesserten Ausbeute). Dazu wurden innerhalb von fünf Minuten 3.11 mL Hydrazin-Monohydrat zugetropft und die Mischung 22 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Dünnschichtchromatographie ($R_f(37)(\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 0.55$) nach 22 Stunden Reaktionszeit nur noch einen Punkt zeigte, wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser (4 °C, sauerstofffrei) unterbrochen. Die Reaktionsmischung wurde mit 3 x 25 mL Diethylether (4 °C, sauerstofffrei) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 unter Argon im Eisbad 1.5 h getrocknet. Das Trockenmittel wurde über eine Fritte (D3) abfiltriert und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinheit der rotbraunen Hydroxylaminoverbindung **37** betrug laut NMR (500 MHz, THF-d_8) >98 %. Aufgrund der allgemeinen Empfindlichkeit der Hydroxylamine wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet.

Ausbeute: 919 mg (2.23 mmol) Hydroxylamino-BODIPY **37**, 95 %.

Schmelzpunkt: 220 °C

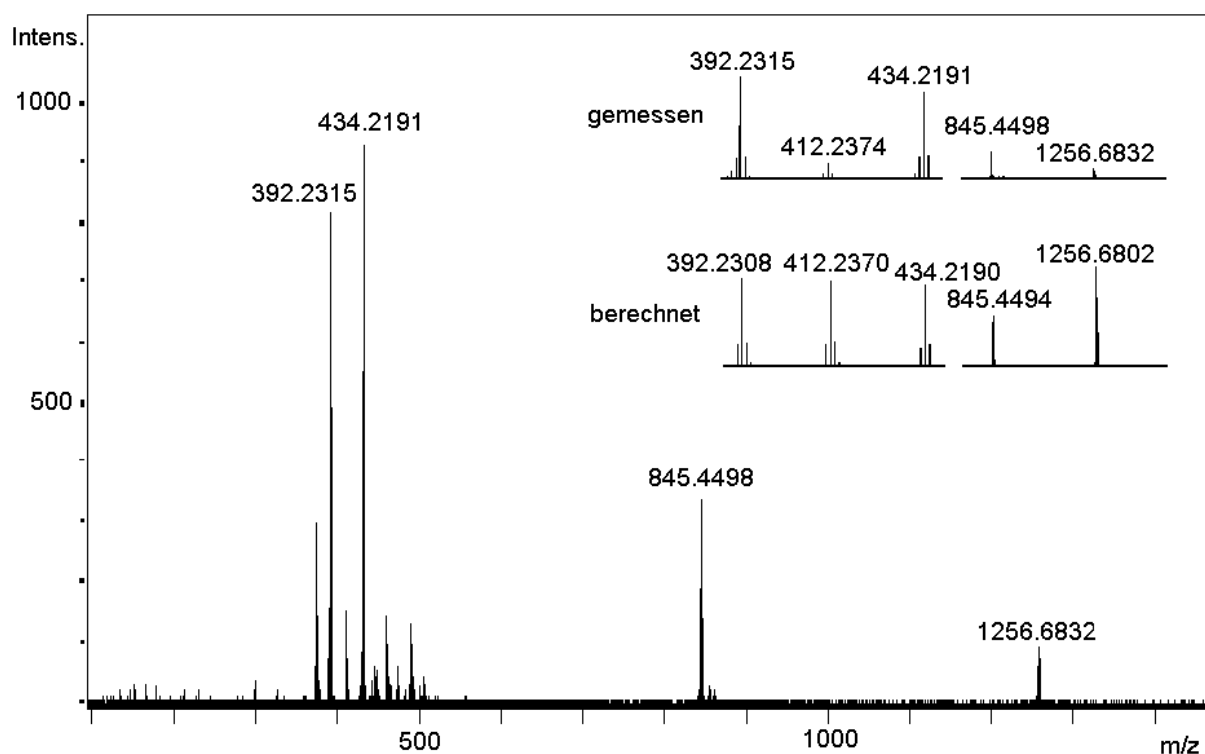
Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 7.81 (s, 1H, NH), 7.68 (s, 1H, OH), 7.10-7.08 (d, 2H, 2-H, 6-H, $^3J\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.45$ Hz, $^3J\{6\text{-H}, 5\text{-H}\} = 8.45$ Hz), 7.05-7.03 (d, 2H, 3-H, 5-H, $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.45$ Hz, $^3J\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 8.45$ Hz), 3.58/1.73 (THF), 2.50 (H₂O), 2.47 (s, 6H, 19-H, 20-H), 2.36-2.31 (q, 4H, 17-H, 21-H, $^3J\{17\text{-H}, 18\text{-H}\} = 7.50$ Hz, $^3J\{21\text{-H}, 22\text{-H}\} = 7.50$ Hz), 1.41 (s, 6H, 16-H, 23-H), 1.00-0.97 (t, 6H, 18-H, 22-H, $^3J\{18\text{-H}, 17\text{-H}\} = 7.50$ Hz, $^3J\{22\text{-H}, 21\text{-H}\} = 7.50$ Hz).

^{13}C -NMR (125 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 12.2 (16-C, 23-C), 12.6 (19-C, 20-C), 15.1 (18-C, 22-C), 17.8 (17-C, 21-C), 114.2 (3-C, 5-C), 127.6 (7-C), 129.4 (2-C, 6-C), 132.3 (8-C, 15-C), 133.0 (10-C, 13-C), 138.8 (9-C, 14-C), 142.5 (1-C), 153.8 (4-C), 154.0 (11-C, 12-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):



berechnet (für $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{BF}_2\text{N}_3\text{ONa}$)	: 434.2190	[M + Na]
gefunden	: 434.2191	
Abweichung	: 0.20 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$)	: 412.2370	[M + H]
gefunden	: 412.2374	
Abweichung	: 1.00 ppm	

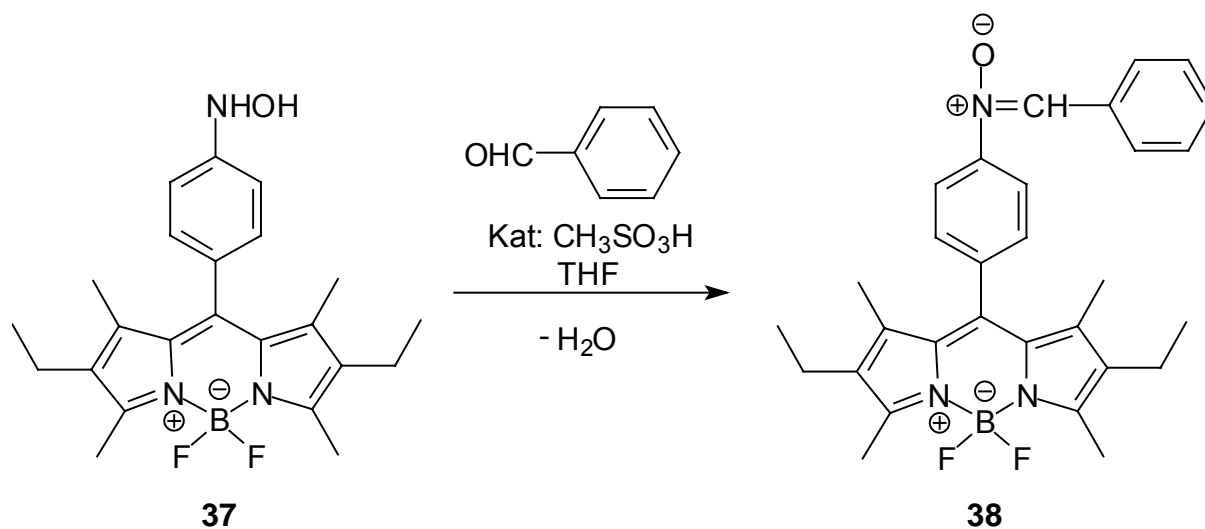
berechnet (für $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$)	: 392.2308	[M + H] - HF
gefunden	: 392.2315	
Abweichung	: 2.00 ppm	

berechnet (für $C_{46}H_{56}B_2F_4N_6O_2Na$)	: 845.4494	[2M + Na]
gefunden	: 845.4498	
Abweichung	: 0.47 ppm	

berechnet (für $C_{69}H_{84}B_3F_6N_9O_3Na$)	: 1256.6802	[3M + Na]
gefunden	: 1256.6832	
Abweichung	: 2.39 ppm	

Fluoreszenzmessung: $\lambda_{exc} = 520$ nm, $\lambda_{em} = 544$ nm, 10 μ M in Chloroform und Benzol.

7.6.19 4,4-DIFLUORO-8-[4-(PHENYLNITRONO)PHENYL]1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**38**)

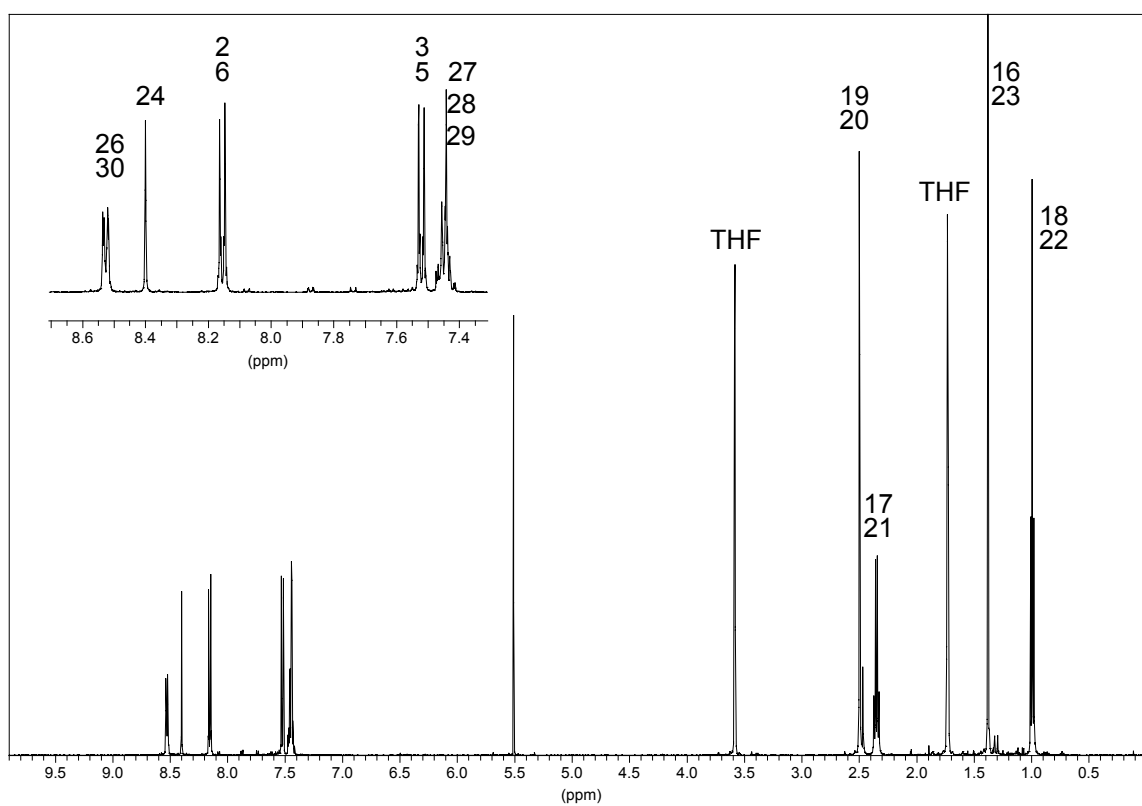
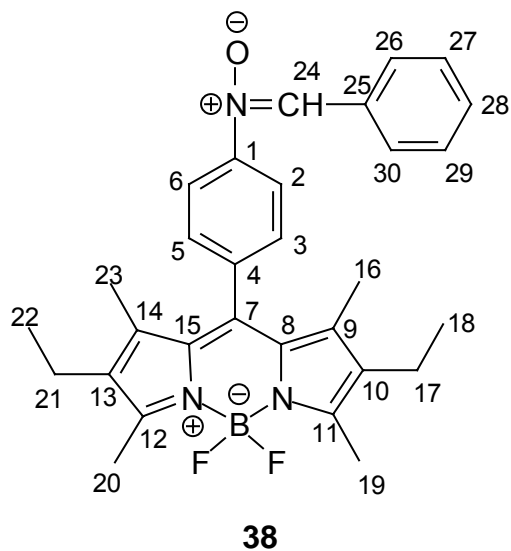


200 mg (0.49 mmol) Hydroxylamin **37** wurden unter Argon in 10 mL THF (abs.) gelöst und mit 49.4 μ L (0.49 mmol) Benzaldehyd (**A6**) versetzt. Nach Zugabe des Katalysators Methansulfonsäure (0.01 mmol) wurde drei Tage bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt. Nachdem die Dünnschichtchromatographie ($R_f(\text{38}) (\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 0.55$) keine Veränderung mehr zeigte, wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer evaporiert und der Rückstand säulenchromatographisch (Aluminiumoxid neutral, 10 % desaktiviert, Eluat: CH_2Cl_2) gereinigt. Die Reinheit der dunkelroten Verbindung **38** betrug laut NMR-Spektrum (500 MHz, THF-d_8) >99 %.

Ausbeute: 130 mg (0.26 mmol) Verbindung **38**, 53 %

Schmelzpunkt: 225-227 °C

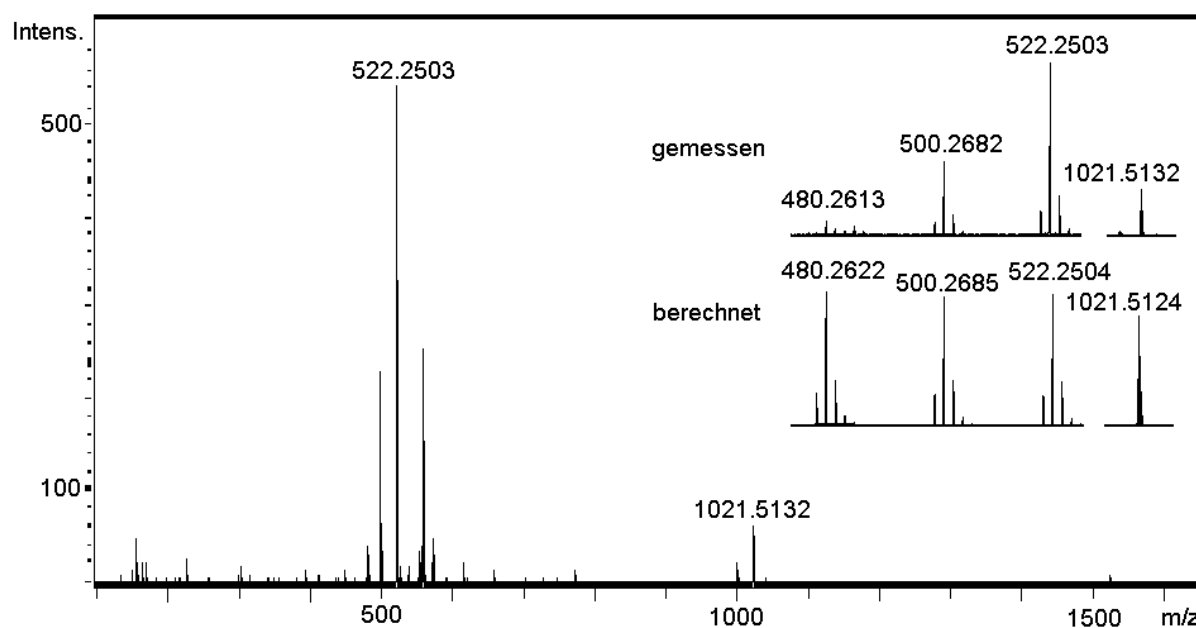
Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 8.54-8.52 (m, 2H, 26-H, 30-H), 8.40 (s, 1H, 24-H), 8.16-8.15 (d, 2H, 2-H, 6-H, $^3J\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.70$ Hz, $^3J\{6\text{-H}, 5\text{-H}\} = 8.70$ Hz), 7.53-7.51 (d, 2H, 3-H, 5-H, $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.70$ Hz, $^3J\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 8.70$ Hz), 7.46-7.44 (m, 3H, 27-H, 28-H, 29-H), 5.51 (CH_2Cl_2), 2.50 (s, 6H, 19-H, 20-H), 2.37-2.33 (q, 4H, 17-H, 21-H, $^3J\{17\text{-H}, 18\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{21\text{-H}, 22\text{-H}\} = 7.60$ Hz), 1.38 (s, 6H, 16-H, 23-H), 1.01-0.98 (t, 6H, 18-H, 22-H, $^3J\{18\text{-H}, 17\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{22\text{-H}, 21\text{-H}\} = 7.60$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 12.2 (16-C, 23-C), 12.6 (19-C, 20-C), 15.0 (18-C, 22-C), 17.7 (17-C, 21-C), 123.1 (2-C, 6-C), 129.2 (27-C, 29-C), 129.7 (26-C, 30-C), 130.2 (3-C, 5-C), 131.1 (28-C), 131.5 (8-C, 15-C), 132.8 (25-C), 133.2 (24-C), 133.6 (10-C, 13-C), 138.3 (1-C), 138.6 (9-C, 14-C), 140.1 (7-C), 150.6 (4-C), 154.9 (11-C, 12-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):



berechnet (für $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{BF}_2\text{N}_3\text{ONa}$) :	522.2504	[M + Na]
gefunden :	522.2503	
Abweichung :	0.20 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$) :	500.2685	[M + H]
gefunden :	500.2682	
Abweichung :	0.60 ppm	

berechnet (für $C_{30}H_{32}BFN_3O$) : 480.2622 [M + H] - HF
 gefunden : 480.2613
 Abweichung : 1.87 ppm

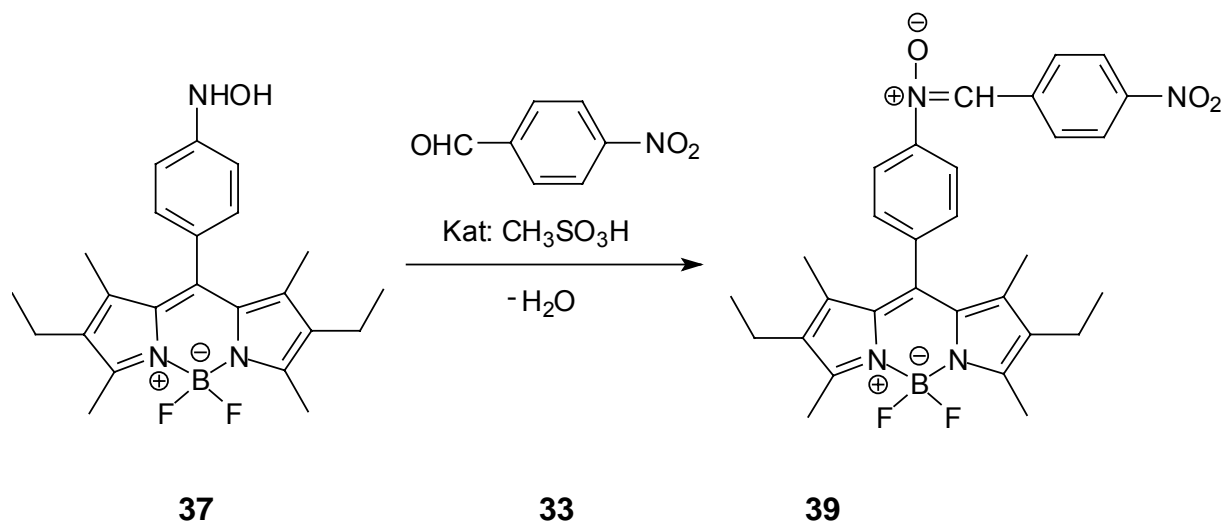
berechnet (für $C_{60}H_{64}B_2F_4N_6O_2Na$): 1021.5124 [2M + Na]
 gefunden : 1021.5132
 Abweichung : 0.78 ppm

Fluoreszenzmessung: $\lambda_{exc} = 525$ nm, $\lambda_{em} = 548$ nm, 10 μ M in Chloroform und Benzol.

$\lambda_{exc} = 520$ nm, $\lambda_{em} = 544$ nm, 10 μ M in Methanol.

UV/Vis-Messung: $\log \varepsilon = 4.66$ ($\lambda_{max} = 529$ nm, Benzol)

7.6.20 4,4-DIFLUORO-8-[4-(4-NITROPHENYLNITRONO)PHENYL]1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**39**)



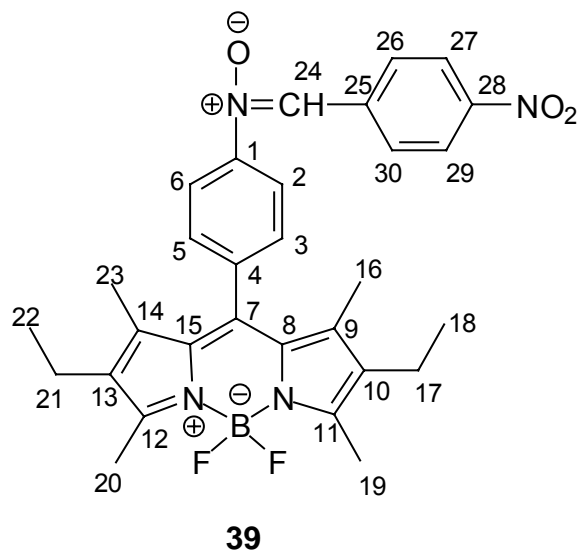
503 mg (1.20 mmol) Hydroxylamin **37** wurden unter Argon in 20 mL THF (abs.) gelöst und mit 173 mg (1.14 mmol) *para*-Nitrobenzaldehyd (**33**) versetzt. Nach Zugabe des Katalysators Methansulfonsäure (2 μ L, 0.01 mmol) wurde drei Tage bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt. Nachdem die

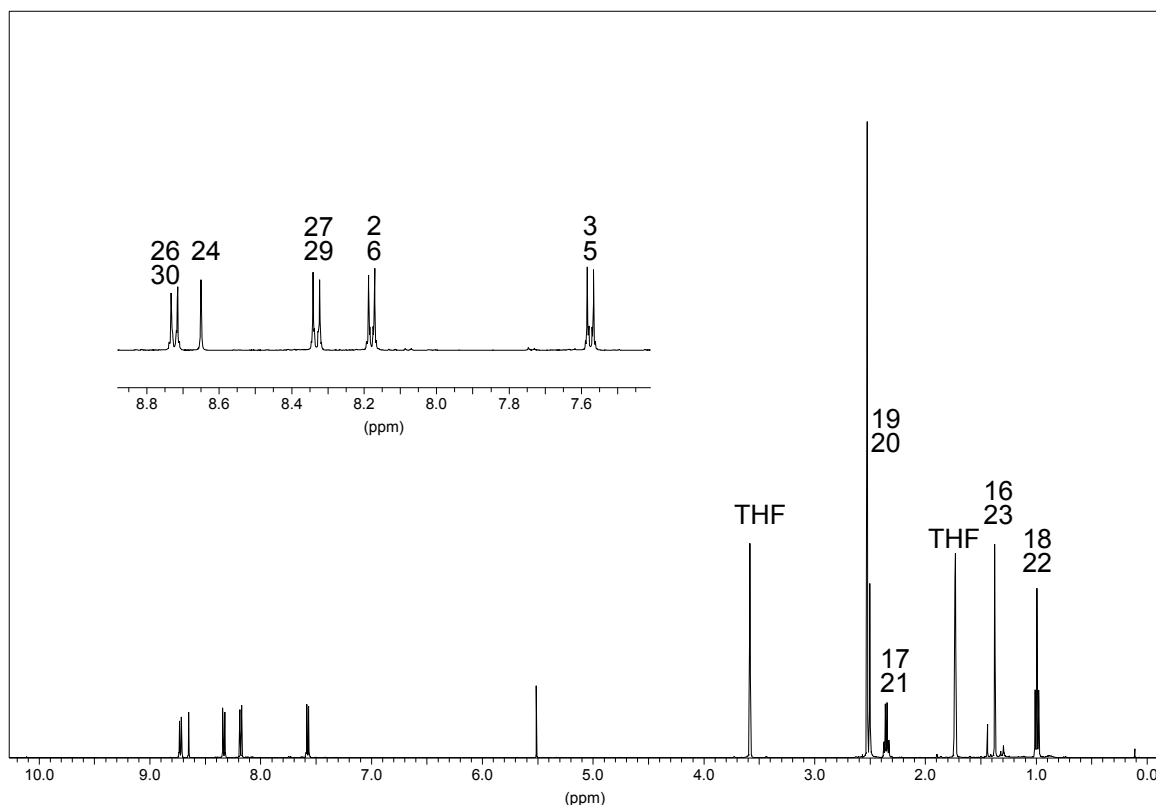
Dünnschichtchromatographie ($R_f(39)$ [$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Cyclohexan} = 3/2$] = 0.12) keine Veränderung mehr aufwies, wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch bei 0 °C (Aluminiumoxid neutral, 10 % desaktiviert, Eluat: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Cyclohexan} = 3:2$) gereinigt. Die Reinheit der dunkelroten Verbindung **39** betrug laut NMR (500 MHz, THF-d_8) >99 %.

Ausbeute: 307 mg (0.56 mmol) Verbindung **39**, 50 %.

Schmelzpunkt: 258 °C

Charakterisierung:

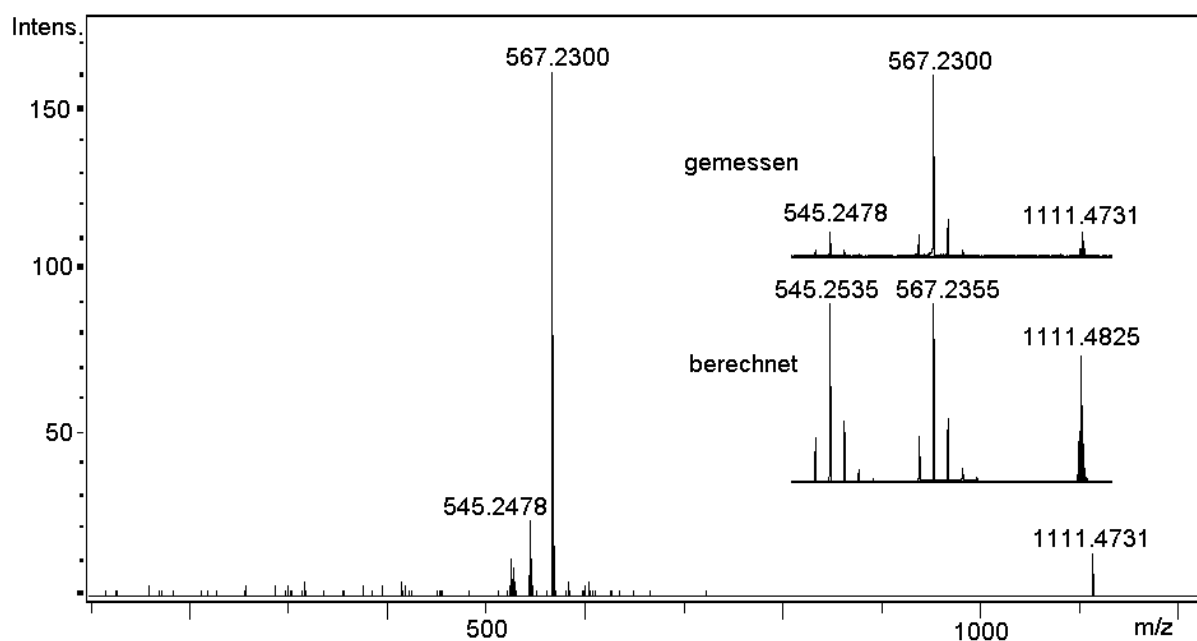




$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 8.73-8.71 (d, 2H, 26-H, 30-H, $^3J\{26\text{-H}, 27\text{-H}\} = 9.00$ Hz, $^3J\{30\text{-H}, 29\text{-H}\} = 9.00$ Hz), 8.65 (s, 1H, 24-H), 8.34-8.32 (d, 2H, 27-H, 29-H, $^3J\{27\text{-H}, 26\text{-H}\} = 9.00$ Hz, $^3J\{29\text{-H}, 30\text{-H}\} = 9.00$ Hz), 8.19-8.17 (d, 2H, 2-H, 6-H, $^3J\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.65$ Hz, $^3J\{6\text{-H}, 5\text{-H}\} = 8.65$ Hz), 7.58-7.57 (d, 2H, 3-H, 5-H, $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.65$ Hz, $^3J\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 8.65$ Hz), 2.51 (H_2O), 2.50 (s, 6H, 19-H, 20-H), 2.37-2.33. (q, 4H, 17-H, 21-H, $^3J\{17\text{-H}, 18\text{-H}\} = 7.50$ Hz, $^3J\{21\text{-H}, 22\text{-H}\} = 7.50$ Hz), 1.37 (s, 6H, 16-H, 23-H), 1.01-0.98 (t, 6H, 18-H, 22-H, $^3J\{18\text{-H}, 17\text{-H}\} = 7.50$ Hz, $^3J\{22\text{-H}, 21\text{-H}\} = 7.50$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 12.3 (16-C, 23-C), 12.6 (19-C, 20-C), 15.0 (18-C, 22-C), 17.7 (17-C, 21-C), 123.1 (2-C, 6-C), 124.5 (27-C, 29-C), 130.1 (26-C, 30-C), 130.5 (3-C, 5-C), 131.4 (8-C, 15-C), 132.1 (24-C), 133.7 (10-C, 13-C), 138.0 (25-C), 138.5 (9-C, 14-C), 139.2 (7-C), 139.8 (4-C), 149.0 (28-C), 150.3 (1-C), 155.0 (11-C, 12-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):



berechnet (für $C_{30}H_{31}BF_2N_4O_3Na$) : 567.2355 [M + Na]

gefunden : 567.2300

Abweichung : 9.70 ppm

berechnet (für $C_{30}H_{32}BF_2N_4O_3$) : 545.2535 [M + H]

gefunden : 545.2478

Abweichung : 10.5 ppm

berechnet (für $C_{60}H_{62}B_2F_4N_8O_6Na$): 1111.4825 [2M + Na]

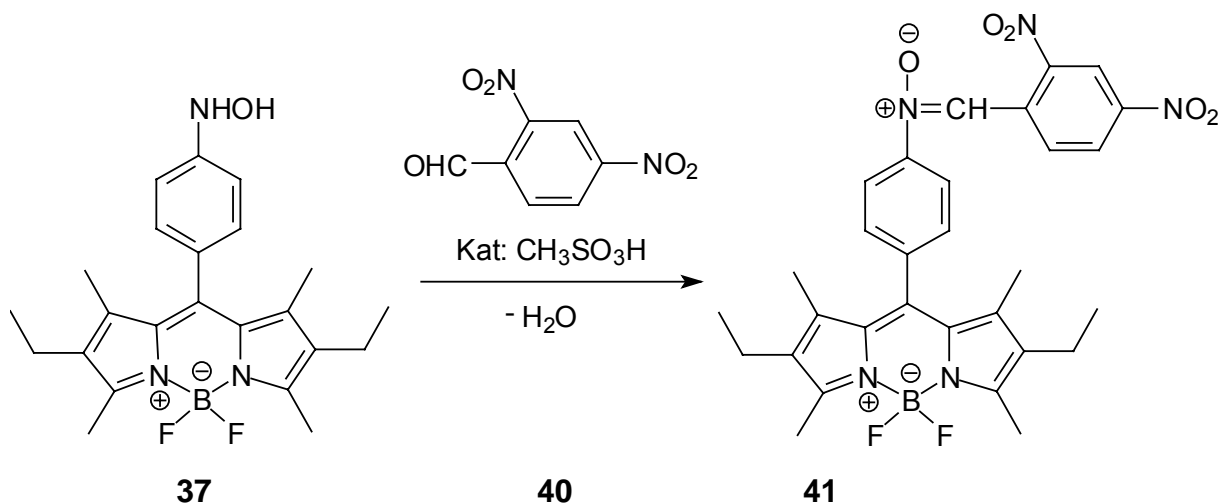
gefunden : 1111.4731

Abweichung : 8.46 ppm

Fluoreszenzmessung: $\lambda_{exc} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 551 \text{ nm}$, 10 μM in Benzol.

UV/Vis-Messung: $\log \varepsilon = 4.70$ ($\lambda_{max} = 530 \text{ nm}$, Benzol)

7.6.21 4,4-DIFLUORO-8-[4-(2,4-DINITROPHENYLNITRONO)PHENYL]1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**41**)

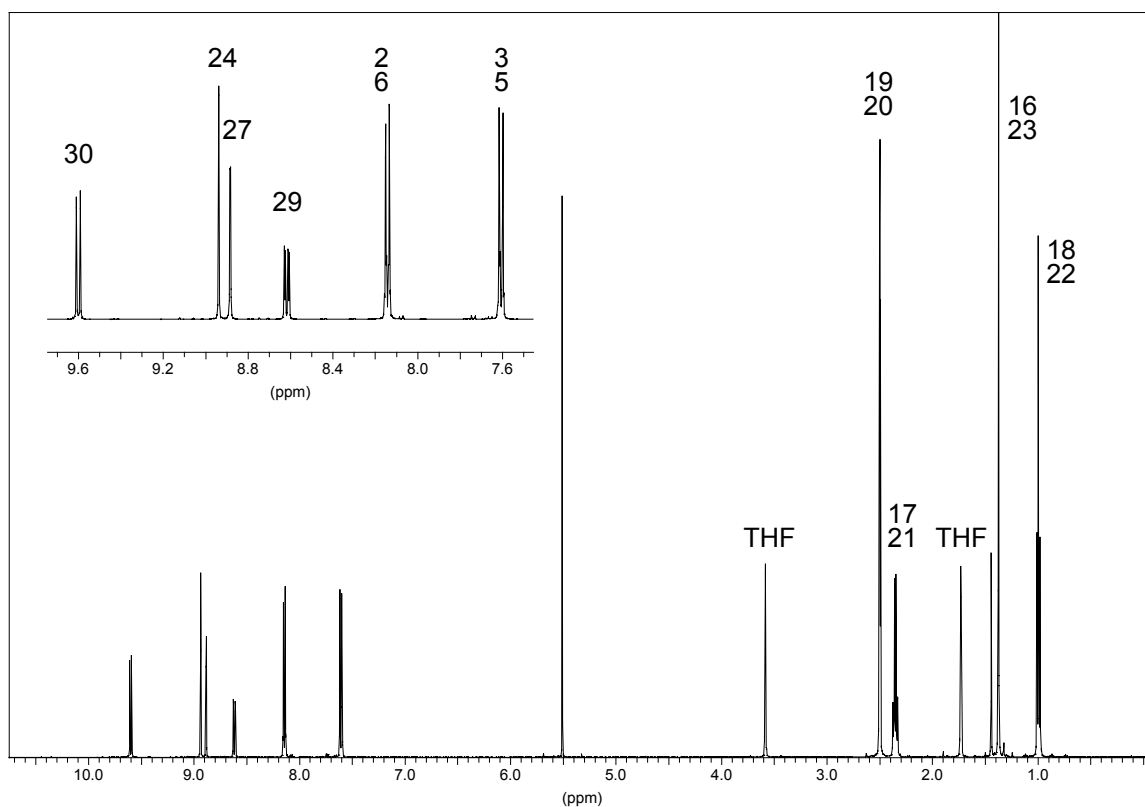
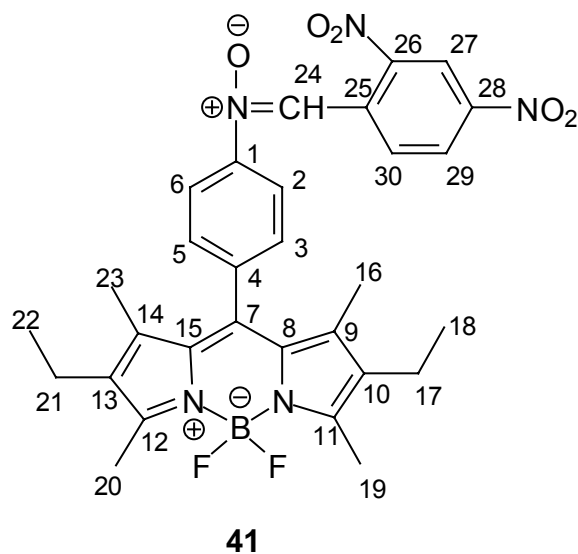


281 mg (0.68 mmol) Hydroxylamin **37** wurden unter Argon in 20 mL THF (abs.) gelöst und mit 137 mg (0.70 mmol) 2,4-Dinitrobenzaldehyd (**40**) versetzt. Nach Zugabe des Katalysators Methansulfonsäure (2 μL , 0.01 mmol) wurde drei Tage bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt. Nachdem die Dünnschichtchromatographie ($R_f(41)$ [$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Cyclohexan} = 3/2$] = 0.15) keine Veränderung mehr aufwies, wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer evaporiert und der Rückstand säulenchromatographisch bei 0 °C (Aluminiumoxid neutral, 10 % desaktiviert, Eluat: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Cyclohexan} = 3:2$) gereinigt. Die Reinheit der dunkelroten Verbindung **41** betrug laut NMR (500 MHz, THF-d_8) 80 %. Aufgrund dessen wurde das Produkt mit einem Gemisch von $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Cyclohexan} = 3:2$ digeriert und der ungelöste Rückstand **41** abfiltriert. Die Reinheit des Produktes **41** betrug > 99 %.

Ausbeute: 34 mg (0.06 mmol) Verbindung **41**, 9 %.

Schmelzpunkt: 214 °C (Zersetzung)

Charakterisierung:

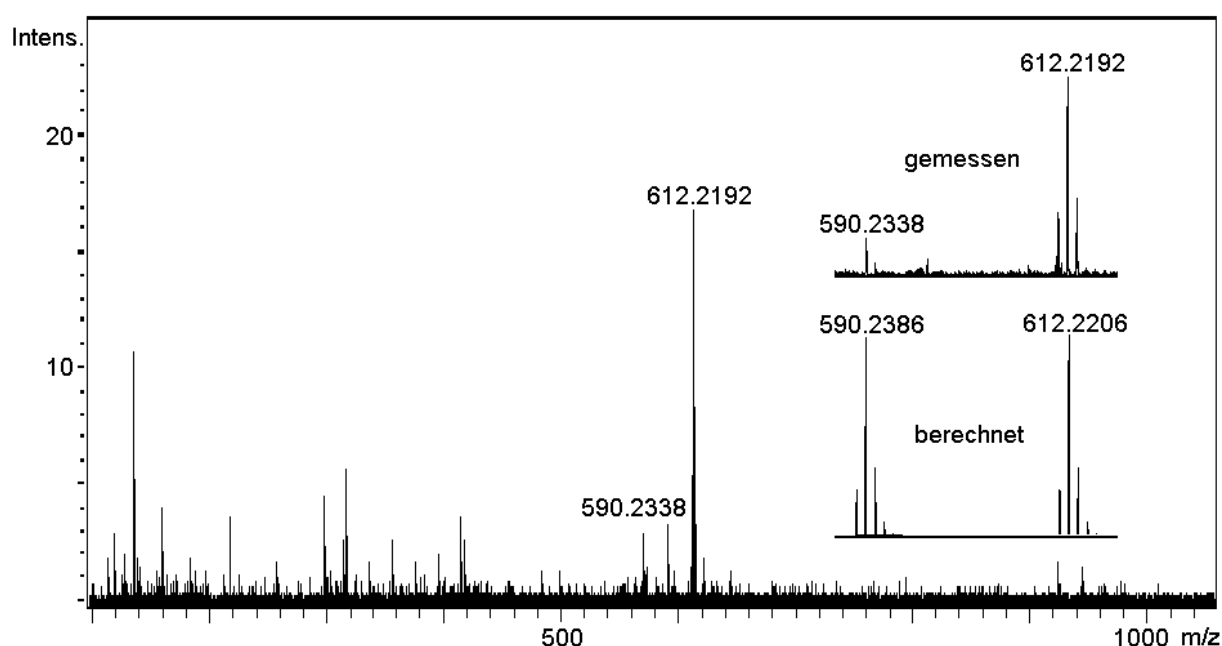


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 9.61-9.59 (d, 1H, 30-H, $^3\text{J}\{30\text{-H}, 29\text{-H}\} = 9.00$ Hz), 8.94 (s, 1H, 24-H), 8.89-8.88 (d, 1H, 27-H, $^4\text{J}\{27\text{-H}, 29\text{-H}\} = 2.40$ Hz), 8.63-8.61 (dd, 1H, 29-H, $^3\text{J}\{29\text{-H}, 30\text{-H}\} = 9.00$ Hz, $^4\text{J}\{29\text{-H}, 27\text{-H}\} = 2.40$ Hz), 8.15-8.13 (d, 2H, 2-H, 6-H, $^3\text{J}\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.65$ Hz, $^3\text{J}\{6\text{-H}, 5\text{-H}\} = 8.65$ Hz), 7.62-7.60 (d, 2H, 3-H, 5-H, $^3\text{J}\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.65$ Hz, $^3\text{J}\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 8.65$ Hz), 2.50 (s, 6H, 19-H, 20-H), 2.37-2.33 (q, 4H, 17-H, 21-H, $^3\text{J}\{17\text{-H}, 18\text{-H}\} = 7.50$ Hz, $^3\text{J}\{21\text{-H}, 22\text{-H}\} = 7.50$ Hz), 1.37 (s, 6H,

16-H, 23-H), 1.01-0.98 (t, 6H, 18-H, 22-H, $^3J\{18\text{-H}, 17\text{-H}\} = 7.50\text{ Hz}$, $^3J\{22\text{-H}, 21\text{-H}\} = 7.50\text{ Hz}$), 5.51 (CH_2Cl_2), 3.58/1.73 (THF), 2.49 (H_2O), 1.44 (Cyclohexan).

^{13}C -NMR (125 MHz, THF-d_8): δ [ppm] = 12.3 (16-C, 23-C), 12.6 (19-C, 20-C), 15.0 (18-C, 22-C), 17.7 (17-C, 21-C), 121.3 (27-C), 123.4 (2-C, 6-C), 127.5 (24-C), 128.3 (29-C), 130.6 (25-C), 130.8 (30-C), 130.8 (3-C, 5-C), 131.4 (8-C, 15-C), 133.8 (10-C, 13-C), 138.5 (9-C, 14-C), 139.5 (7-C), 139.9 (4-C), 148.3 (26-C), 148.9 (28-C), 150.4 (1-C), 155.1 (11-C, 12-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):



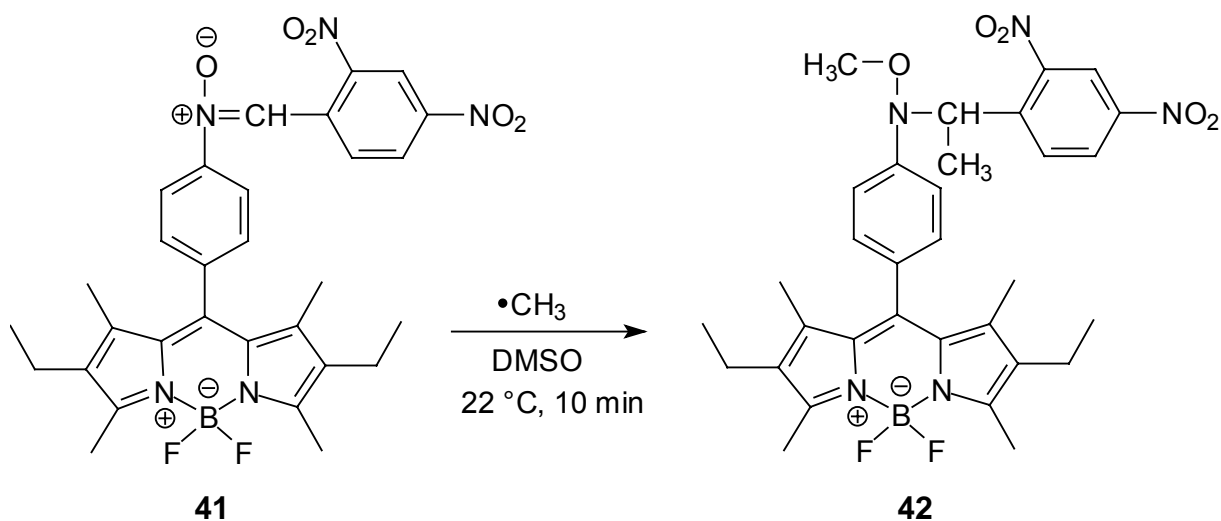
berechnet (für $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_5\text{Na}$) :	612.2206	[M + Na]
gefunden :	612.2192	
Abweichung :	2.30 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_5$) :	590.2386	[M + H]
gefunden :	590.2338	
Abweichung :	8.10 ppm	

Fluoreszenzmessung: $\lambda_{\text{exc}} = 525\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 551\text{ nm}$, 10 μM in Benzol.

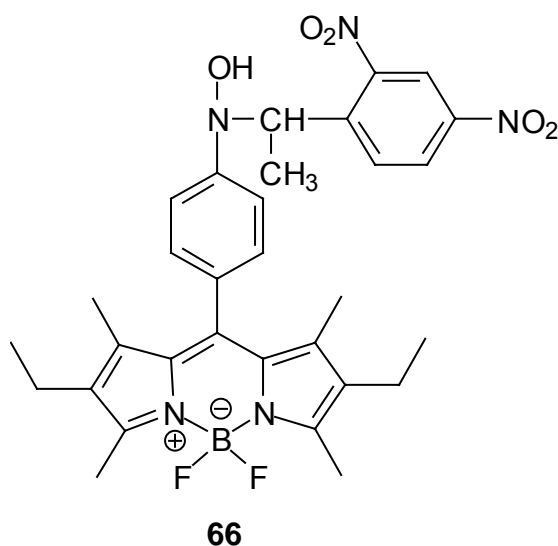
UV/Vis-Messung: $\log \varepsilon = 4.71$ ($\lambda_{\text{max}} = 531\text{ nm}$, Benzol)

7.6.22 4,4-DIFLUORO-8-{4-[2,4-DINITROPHENYL(N-ETHYL-METHOXYHYDROXYLAMINO) PHENYL]}1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (42)



40.0 mg (0.07 mmol) Nitron **41** wurden unter Schutzgas in 10.0 mL DMSO p.a. gelöst und eine gelbe Lösung von 254 mg (2.00 mmol) Eisen(II)-chlorid in 10.0 mL DMSO p.a. zugegeben. Die rote Lösung wurde mit 204 μM (2.00 mmol) 30proz. Wasserstoffperoxid versetzt und 10 Minuten bei 22 °C gerührt. Dabei verfärbte sich die Mischung dunkelbraun. Nach Zugabe von 25.0 mL Wasser wurde die Mischung mit Chloroform (3 x 30 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser (2 x 30 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2 x 30 mL) gewaschen und eine Stunde über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde ein dunkelrotes Rohprodukt erhalten, welches in 2 mL Methanol p.a. aufgenommen und eine Stunde im Ultraschallbad belassen wurde. Die Suspension wurde über Nacht im Gefrierschrank aufbewahrt und der rote Feststoff anschließend abzentrifugiert. Der Zentrifugenrückstand wurde nochmals mit 2 mL Methanol p.a. gewaschen, abzentrifugiert, im Ölpumpenvakuum bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mittels NMR-Spektroskopie und ESI-TOF untersucht. Dabei wurde im NMR-Spektrum (sowohl im Rohprodukt als auch im isolierten Produkt) lediglich das durch Abfang zweier Methylradikale entstandene Methylhydroxylamin **42** nachgewiesen, während im ESI-TOF auch das durch Abfang eines Methylradikals und anschließender Reduktion entstandene Produkt **66** auftrat. Die Ursache dafür kann zum einen in einer eventuell höheren ESI-Aktivität der Verbindung **66** liegen, so dass bereits eine sehr geringe Menge ein

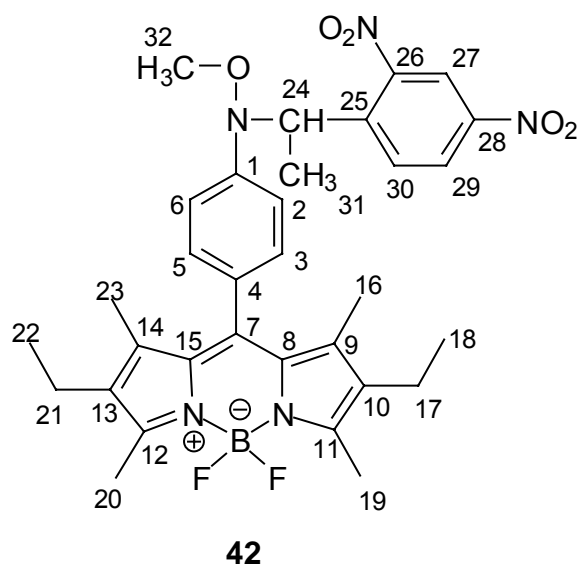
intensives Signal im ESI-TOF erzeugt. Zum anderen könnte durch die Ionisierung während der ESI-TOF-Untersuchung die Verbindung **42** in die Verbindung **66** überführt worden sein.



Ausbeute: 15.6 mg (0.03 mmol) Methylhydroxylamin **42**, 43 %.

Schmelzpunkt: 203 °C

Charakterisierung:

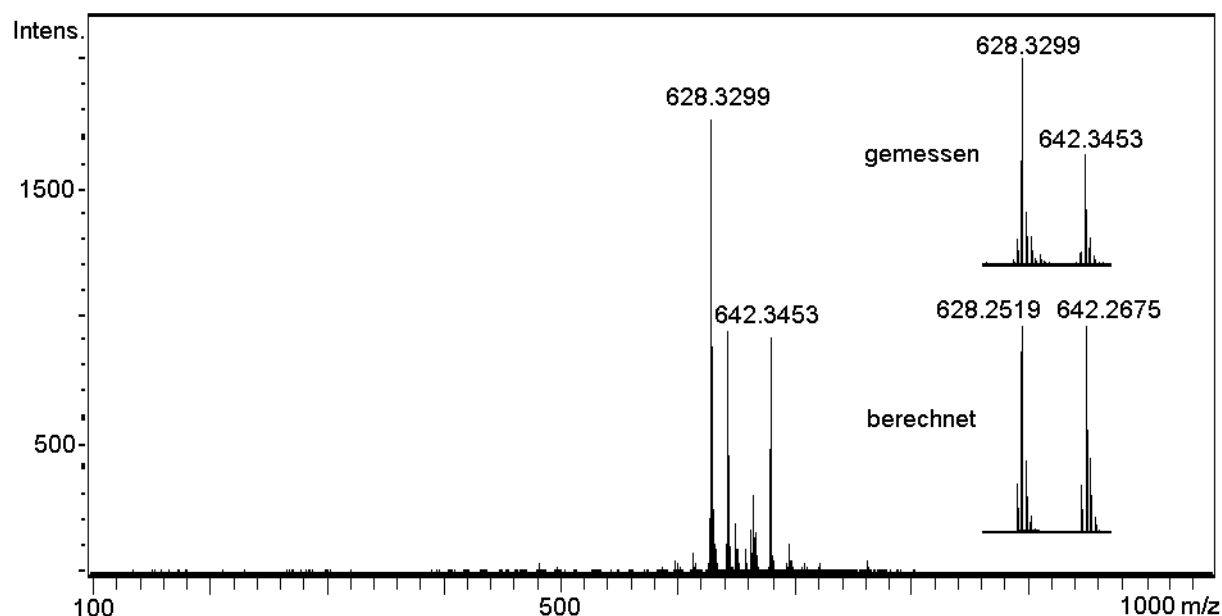


¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.63-8.63 (d, 1H, 27-H, ⁴J{27-H, 29-H} = 2.40 Hz), 8.43-8.41 (dd, 1H, 29-H, ³J{29-H, 30-H} = 9.00 Hz, ⁴J{29-H, 27-H} = 2.40 Hz), 8.10-8.08 (d, 1H, 30-H, ³J{30-H, 29-H} = 9.00 Hz), 7.20 (m, 4H, 2-H, 3-H, 5-H, 6-H), 5.38-5.34 (q, 1H, 24-H, ³J{24-H, 31-H} = 6.80 Hz), 3.38 (s, 3H, 32-H), 2.52 (s, 6H, 19-H, 20-H), 2.30-2.27 (q, 4H, 17-H, 21-H, ³J{17-H, 18-H} = 7.50 Hz, ³J{21-H,

22-H} = 7.50 Hz), 2.17 (Aceton), 1.54-1.53 (d, 3H, 31-H, $^3J\{31\text{-H}, 24\text{-H}\} = 6.80$ Hz), 1.24 (s, 6H, 16-H, 23-H), 1.00-0.98 (t, 6H, 18-H, 22-H, $^3J\{18\text{-H}, 17\text{-H}\} = 7.50$ Hz, $^3J\{22\text{-H}, 21\text{-H}\} = 7.50$ Hz).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.8 (16-C, 23-C), 12.6 (19-C, 20-C), 14.7 (18-C, 22-C), 17.2 (17-C, 21-C), 31.1 (31-C), 60.8 (24-C), 61.5 (32-C), 119.6 (2-C, 6-C), 119.6 (3-C, 5-C), 126.5 (27-C), 129.4 (29-C), 131.0 (25-C), 131.1 (30-C), 131.7 (8-C, 15-C), 133.0 (10-C, 13-C), 138.3 (9-C, 14-C), 139.7 (7-C), 143.5 (4-C), 146.9 (26-C), 149.1 (28-C), 150.0 (1-C), 153.9 (11-C, 12-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):



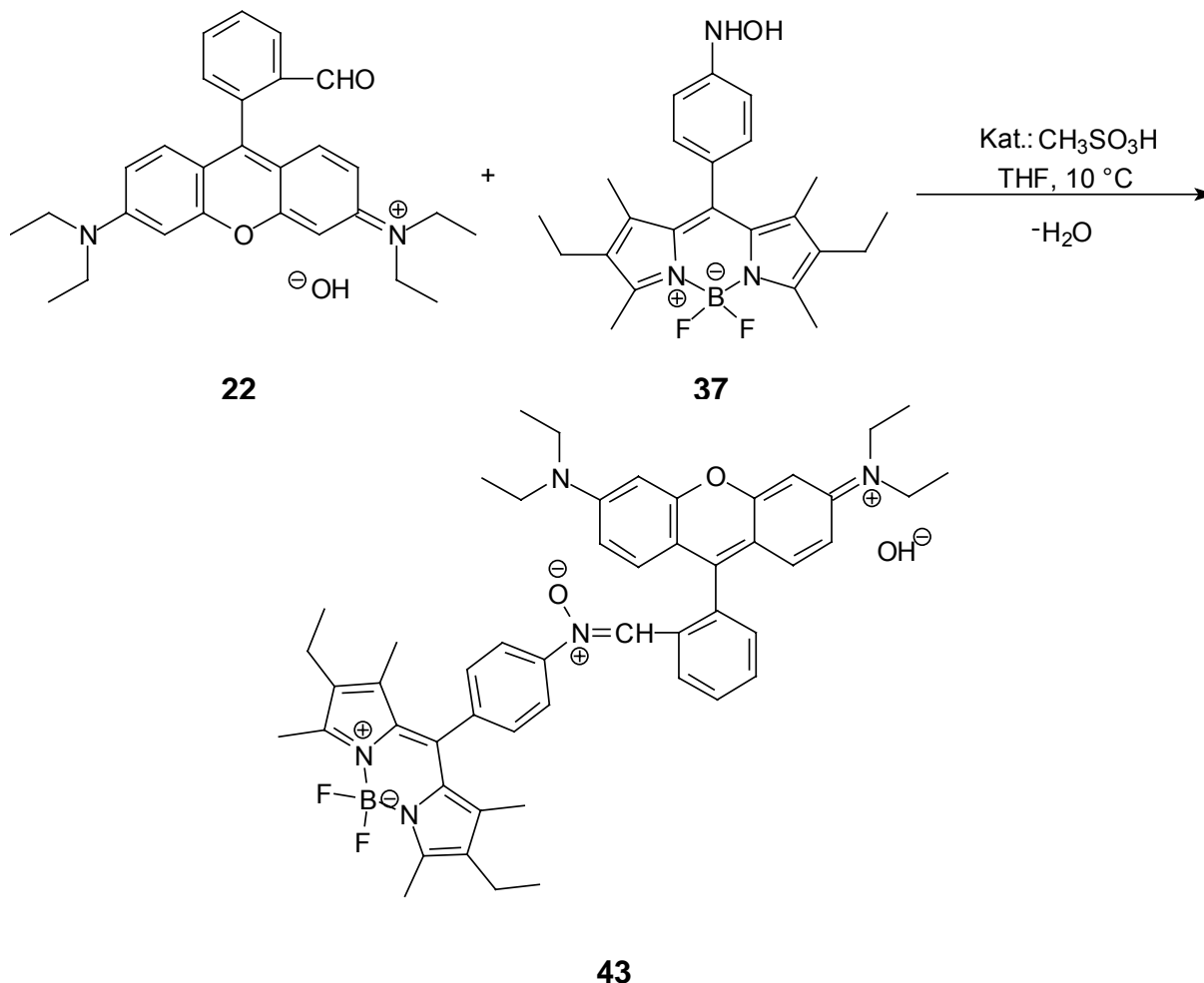
berechnet (für $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_5\text{Na}$) :	642.2675	$[\text{M}(\mathbf{42}) + \text{Na}]$
gefunden :	642.3453	
Abweichung :	12.1 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_5\text{Na}$):	628.2519	$[\text{M}(\mathbf{66}) + \text{Na}]$
gefunden :	628.3299	
Abweichung :	12.4 ppm	

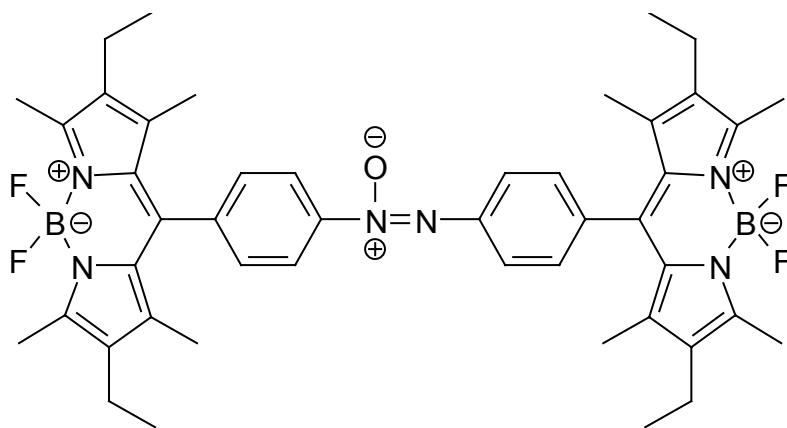
Fluoreszenzmessung: $\lambda_{\text{exc}} = 525$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 548$ nm, 10 μM in Chloroform.

UV/Vis-Messung: $\log \varepsilon = 4.87$ ($\lambda_{\text{max}} = 528$ nm, Chloroform)

7.6.23 4,4-DIFLUORO-8-(4-PHENYLNITRONO-RHODAMIN B)-1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**43**)



Zu einer Lösung von 226 mg (0.53 mmol) Rhodamin B-Aldehyd **22** in 40.0 mL THF p.a. wurden 2 μL Methansulfonsäure bei 0°C zugegeben. Anschließend wurden im Abstand von 30 Minuten 469 mg (1.14 mmol) Hydroxylamino-BODIPY **37** in sieben Portionen zugegeben und über Nacht bei 0°C gerührt. Die dabei ausfallende, nicht in der Literatur bekannte Azoxyverbindung **44** wurde durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

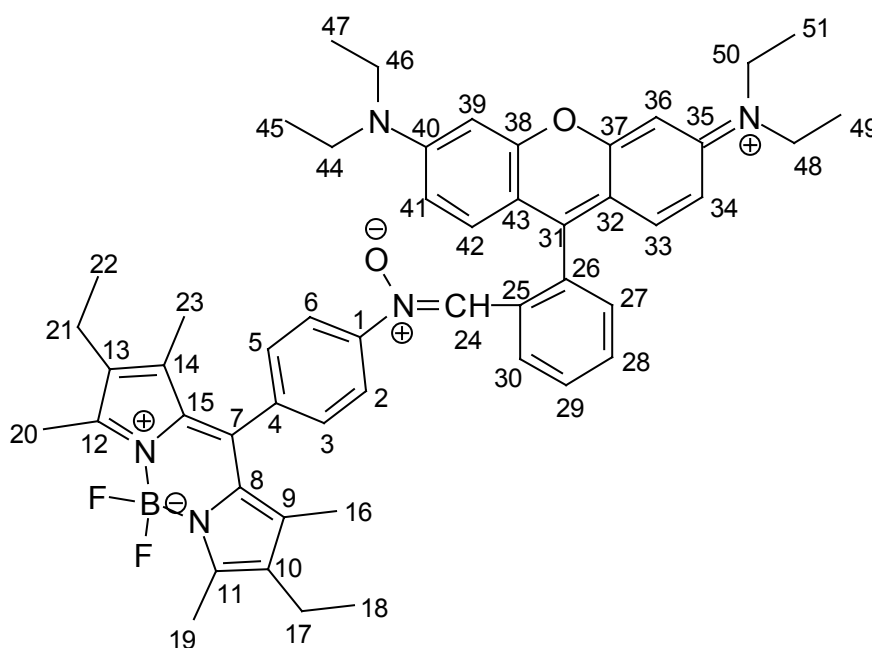
**44**

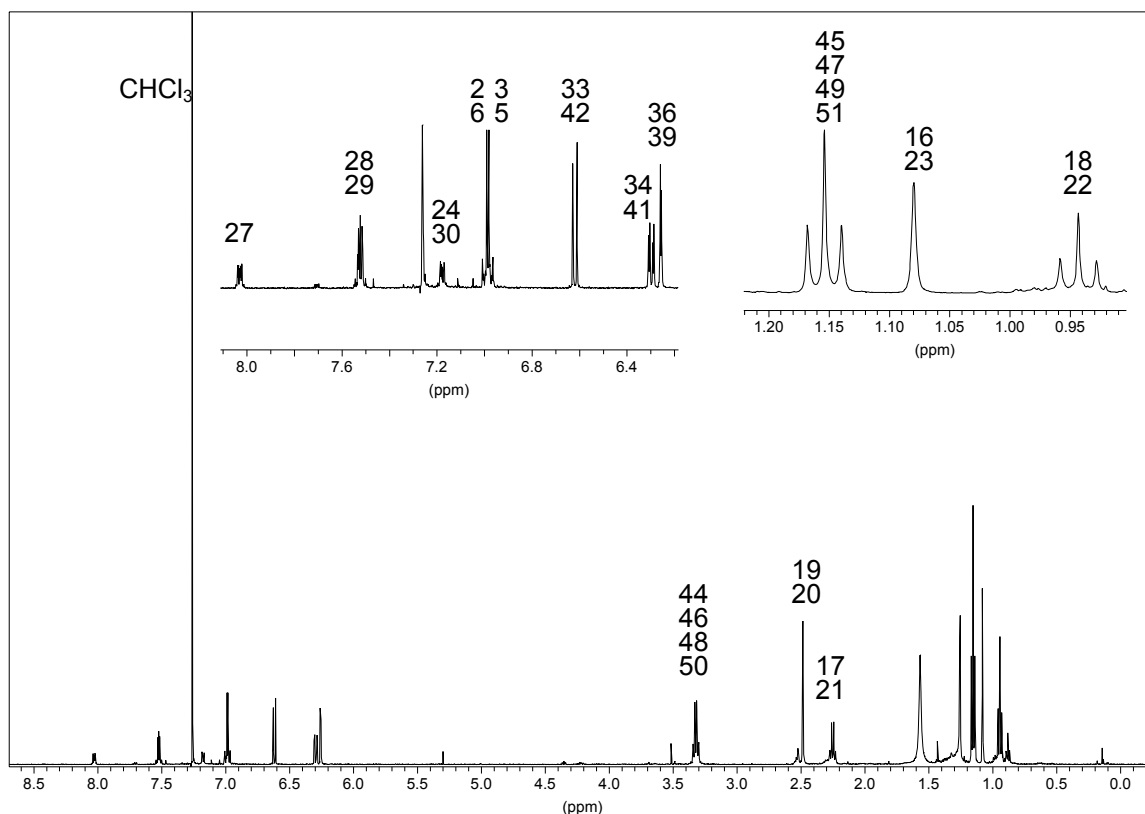
Überschüssiges Rhodamin B-Aldehyd **22** wurde durch Filtration über eine Aluminiumoxid-Säule (10 % deaktiviert) mit Dichlormethan als Eluat entfernt. Das erhaltene Rohprodukt (ca. 240 mg) wurde durch Säulenchromatographie mit RP18 als stationärer Phase und Methanol als Eluat gereinigt.

Ausbeute: 30 mg (0.04 mmol) BODIPY-Rhodaminnitron **43**, 7 %.

Schmelzpunkt: 269 °C (Zersetzung)

Charakterisierung:

**43**

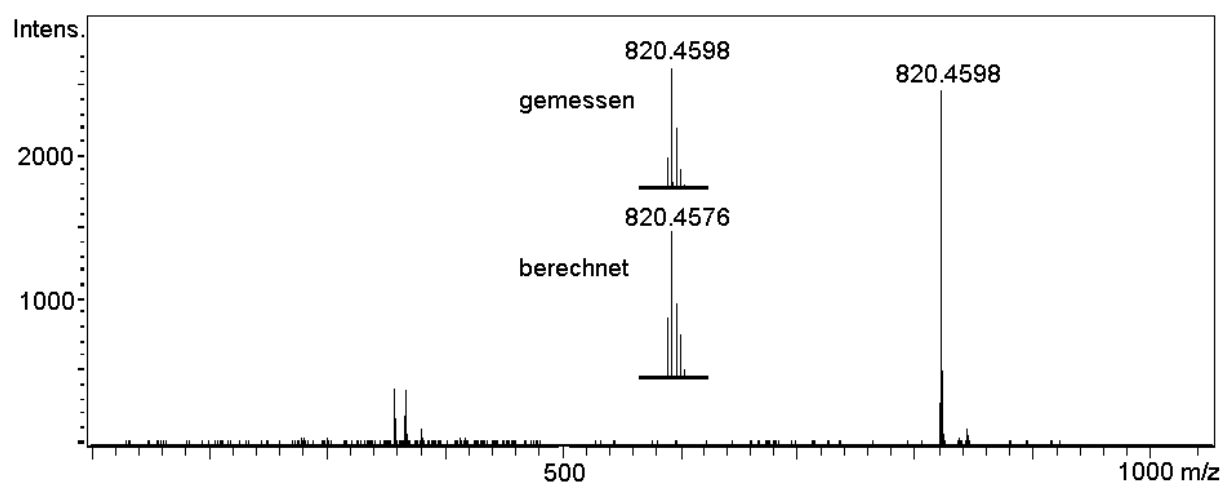


^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.04-8.02 (m, 1H, 27-H), 7.53-7.52 (m, 2H, 28-H, 29-H), 7.19-7.17 (m, 2H, 24-H, 30-H), 7.01-6.96 (d, 2H, 2-H, 6-H, $^3\text{J}\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.85$ Hz, $^3\text{J}\{6\text{-H}, 5\text{-H}\} = 8.85$ Hz), 7.01-6.96 (d, 2H, 3-H, 5-H, $^3\text{J}\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.85$ Hz, $^3\text{J}\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 8.85$ Hz), 6.63-6.61 (d, 2H, 33-H, 42-H, $^3\text{J}\{33\text{-H}, 34\text{-H}\} = 8.85$ Hz, $^3\text{J}\{42\text{-H}, 41\text{-H}\} = 8.85$ Hz), 6.31-6.29 (dd, 2H, 34-H, 41-H, $^3\text{J}\{34\text{-H}, 33\text{-H}\} = 8.85$ Hz, $^3\text{J}\{41\text{-H}, 42\text{-H}\} = 8.85$ Hz, $^4\text{J}\{34\text{-H}, 36\text{-H}\} = 2.60$ Hz, $^4\text{J}\{41\text{-H}, 39\text{-H}\} = 2.60$ Hz), 6.26-6.25 (d, 2H, 36-H, 39-H, $^4\text{J}\{36\text{-H}, 34\text{-H}\} = 2.60$ Hz, $^4\text{J}\{39\text{-H}, 41\text{-H}\} = 2.60$ Hz), 3.51 (Methanol), 3.34-3.30 (q, 12-H, 44-H, 46-H, 48-H, 50-H, $^3\text{J}\{44\text{-H}, 45\text{-H}\} = 7.10$ Hz, $^3\text{J}\{46\text{-H}, 47\text{-H}\} = 7.10$ Hz, $^3\text{J}\{48\text{-H}, 49\text{-H}\} = 7.10$ Hz, $^3\text{J}\{50\text{-H}, 51\text{-H}\} = 7.10$ Hz), 2.25 (s, 6H, 19-H, 20-H), 2.27-2.23 (q, 4H, 17-H, 21-H, $^3\text{J}\{17\text{-H}, 18\text{-H}\} = 7.50$ Hz, $^3\text{J}\{21\text{-H}, 22\text{-H}\} = 7.50$ Hz), 1.57 (H_2O), 1.43 (Cyclohexan), 1.25/0.88/0.14 (Fett), 1.17-1.14 (t, 12H, 45-H, 47-H, 49-H, 51-H, $^3\text{J}\{45\text{-H}, 44\text{-H}\} = 7.10$ Hz, $^3\text{J}\{47\text{-H}, 46\text{-H}\} = 7.10$ Hz, $^3\text{J}\{49\text{-H}, 48\text{-H}\} = 7.10$ Hz, $^3\text{J}\{51\text{-H}, 50\text{-H}\} = 7.10$ Hz), 1.08 (s, 6H, 16-H, 23-H), 0.96-0.93 (t, 6H, 18-H, 22-H, $^3\text{J}\{18\text{-H}, 17\text{-H}\} = 7.50$ Hz, $^3\text{J}\{22\text{-H}, 21\text{-H}\} = 7.50$ Hz).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.8 (16-C, 23-C), 12.6 (19-C, 20-C), 12.8 (45-C, 47-C, 49-C, 51-C), 14.8 (18-C, 22-C), 17.2 (17-C, 21-C), 44.4 (44-C, 46-C,

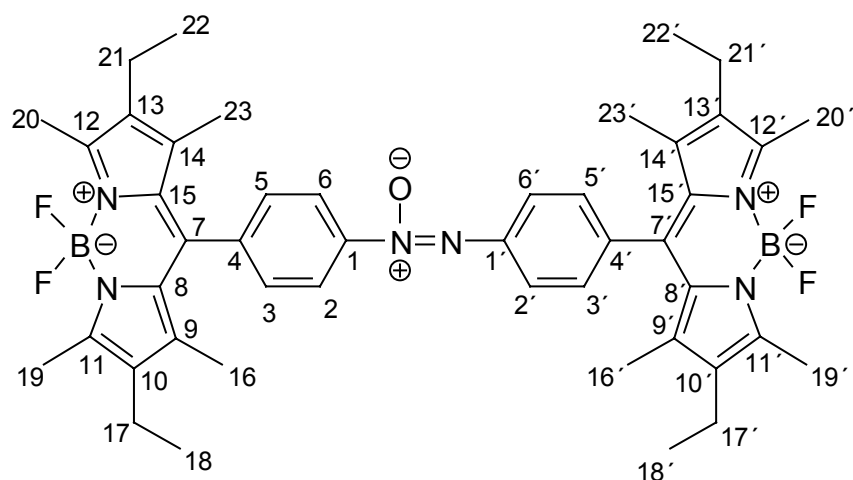
48-C, 50-C), 97.7 (36-C, 39-C), 106.4 (37-C, 38-C), 108.3 (34-C, 41-C), 123.5 (27-C), 124.3 (30-C), 127.1 (2-C, 6-C), 128.4 (3-C, 5-C), 128.4 (28-C), 129.0 (24-C), 129.1 (33-C, 42-C), 130.8 (8-C, 15-C), 131.1 (26-C), 132.7 (10-C, 13-C), 133.2 (29-C), 133.5 (4-C), 138.1 (1-C), 138.9 (9-C, 14-C), 140.0 (7-C), 148.9 (35-C, 40-C), 153.2 (32-C, 43-C), 153.4 (31-C), 153.6 (11-C, 12-C), 167.7 (25-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):

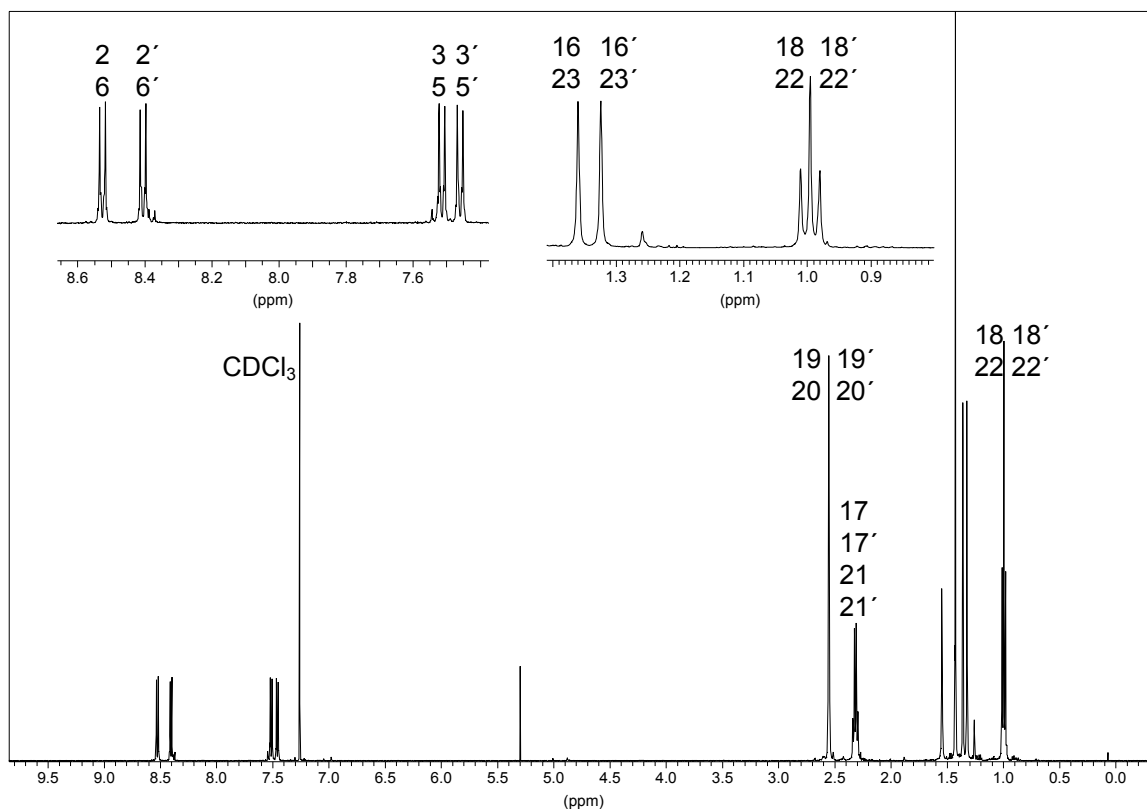


berechnet (für $C_{51}H_{57}BF_2N_5O_2$)	: 820.4576	[M + H]
gefunden	: 820.4598	
Abweichung	: 2.68 ppm	

Charakterisierung der Azoxyverbindung **44**:



44

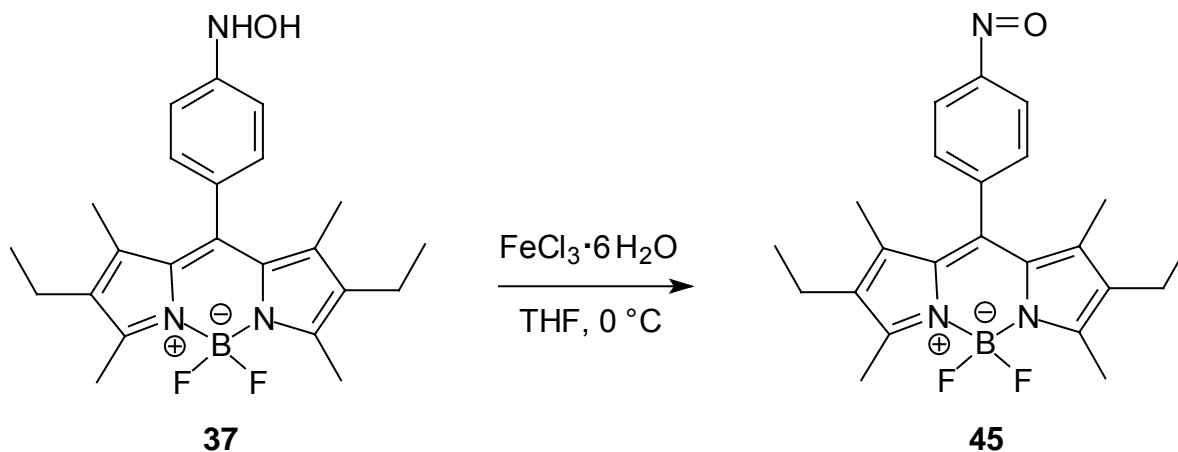


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.53-8.52 (d, 2H, 2-H, 6-H, $^3J\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.40$ Hz, $^3J\{6\text{-H}, 5\text{-H}\} = 8.40$ Hz), 8.41-8.40 (d, 2H, 2'-H, 6'-H, $^3J\{2'\text{-H}, 3'\text{-H}\} = 8.40$ Hz, $^3J\{6'\text{-H}, 5'\text{-H}\} = 8.40$ Hz), 7.52-7.51 (d, 2H, 3-H, 5-H, $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.40$ Hz, $^3J\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 8.40$ Hz), 7.47-7.45 (d, 2H, 3'-H, 5'-H, $^3J\{3'\text{-H}, 2'\text{-H}\} = 8.40$ Hz, $^3J\{5'\text{-H}, 6'\text{-H}\} = 8.40$ Hz), 5.30 (CH_2Cl_2), 2.55 (s, 12H, 19-H, 20-H, 19'-H, 20'-H), 2.34-2.30 (q, 8H, 17-H, 21-H, 17'-H, 21'-H, $^3J\{17\text{-H}, 18\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{21\text{-H}, 22\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{17'\text{-H}, 18'\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{21'\text{-H}, 22'\text{-H}\} = 7.60$ Hz), 1.55 (H_2O), 1.43 (Cyclohexan), 1.36 (s, 6H, 16-H, 23-H), 1.32 (s, 6H, 16'-H, 23'-H), 1.01-0.98 (t, 12H, 18-H, 22-H, 18'-H, 22'-H, $^3J\{18\text{-H}, 17\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{22\text{-H}, 21\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{18'\text{-H}, 17'\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{22'\text{-H}, 21'\text{-H}\} = 7.60$ Hz).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.0 (16'-C, 23'-C), 12.1 (16-C, 23-C), 12.7 (19-C, 20-C), 14.7 (18'-C, 22'-C), 14.8 (18-C, 22-C), 17.2 (17-C, 17'-C, 21-C, 21'-C), 123.3 (2'-C, 6'-C), 126.7 (2-C, 6-C), 129.2 (3'-C, 5'-C), 129.5 (3-C, 5-C), 130.1 (8'-C, 15'-C), 130.5 (7'-C), 130.7 (7-C), 133.2 (9'-C, 14'-C), 133.4 (9-C, 14-C), 137.8 (8-C, 15-C), 138.0 (10'-C, 13'-C), 138.1 (10-C, 13-C), 138.3 (4'-C), 139.1 (1'-C), 144.2 (1-C), 148.5 (4-C), 154.3 (11'-C, 12'-C), 154.7 (11-C, 12-C).

Schmelzpunkt: 353 °C (Zersetzung)

7.6.24 4,4-DIFLUORO-8-(4-NITROSOPHENYL)1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**45**)

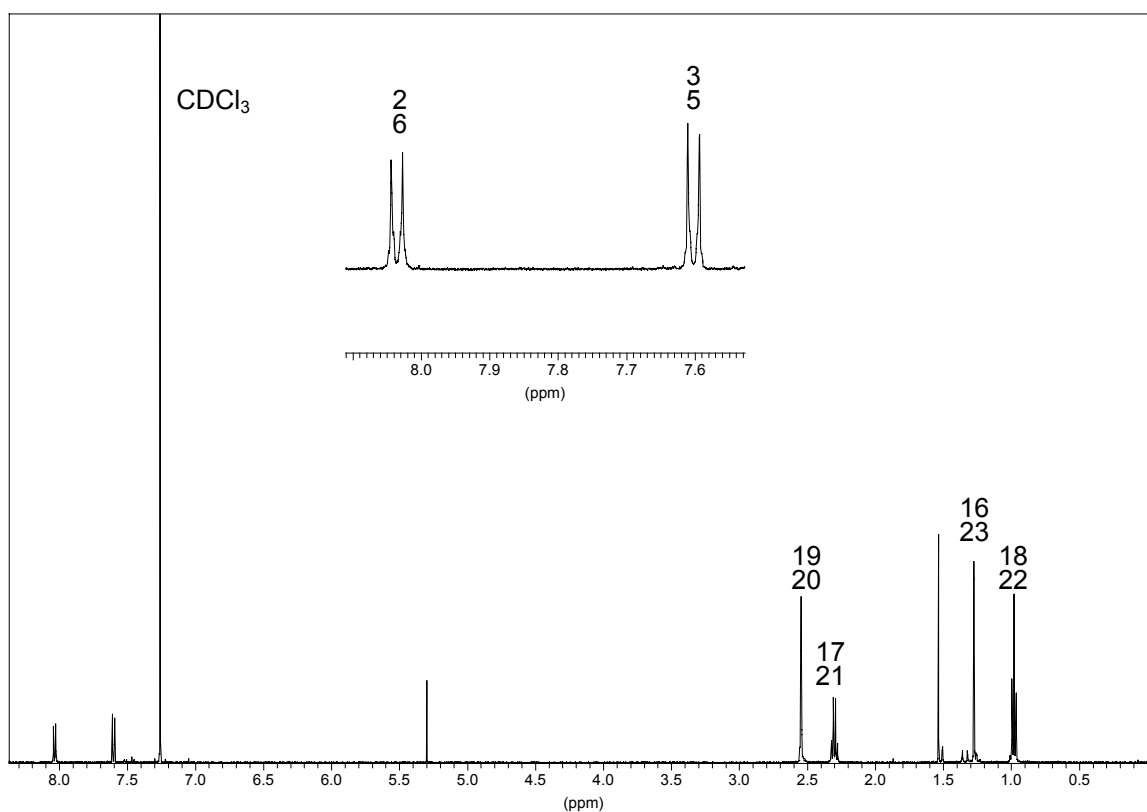
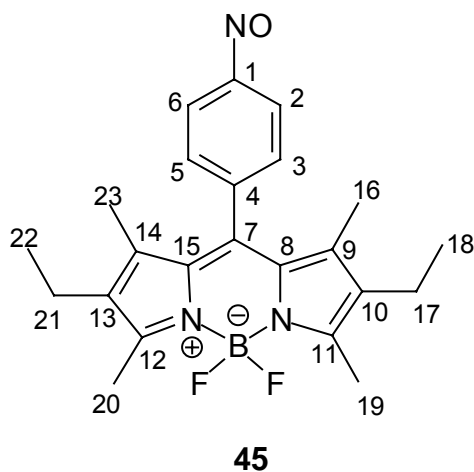


216 mg (0.53 mmol) Hydroxylamino-BODIPY **37** wurden in 50 mL THF (abs.) gelöst und unter Rühren bei 0 °C mit 360 mg (1.33 mmol) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ versetzt. Es wurde insgesamt 15 Minuten bei dieser Temperatur gerührt und dabei eine Reaktionskontrolle mittels DC (Siliziumdioxid, Eluat: Dichlormethan) durchgeführt. Zur Mischung wurden 50 mL Wasser gegeben und mit Diethylether (3 x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (3 x 40 mL) und mit gesättigter NaCl-Lösung (3 x 30 mL) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit Dichlormethan ($R_{f(45)}[\text{SiO}_2, \text{CH}_2\text{Cl}_2] = 0.75$). Zur Erreichung eines Reinheitsgrades von >99 % wurde die Substanz mehrmals säulenchromatographisch bei 0 °C gereinigt.

Ausbeute: 148 mg (0.36 mmol) Nitroso-BODIPY **45**, 68 %.

Schmelzpunkt: 159 °C (Zersetzung)

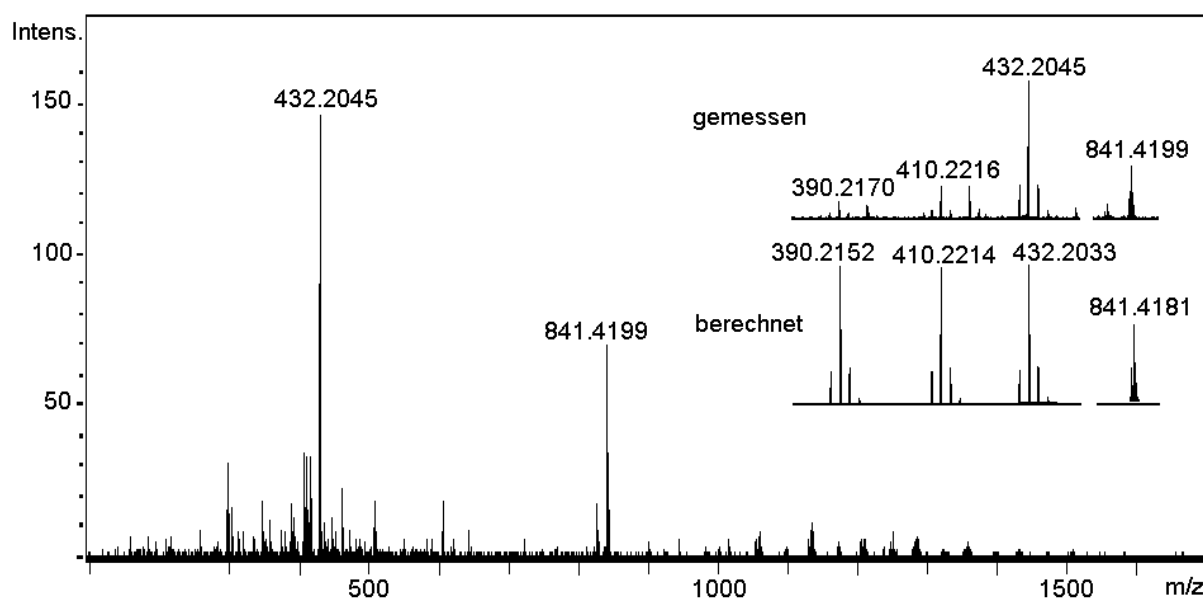
Charakterisierung:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8.04-8.03 (d, 2H, 2-H, 6-H, $^3J\{2\text{-H}, 3\text{-H}\} = 8.40$ Hz, $^3J\{6\text{-H}, 5\text{-H}\} = 8.40$ Hz), 7.61-7.59 (d, 2H, 3-H, 5-H, $^3J\{3\text{-H}, 2\text{-H}\} = 8.40$ Hz, $^3J\{5\text{-H}, 6\text{-H}\} = 8.40$ Hz), 5.30 (CH_2Cl_2), 2.55 (s, 6H, 19-H, 20-H), 2.32-2.28 (q, 4H, 17-H, 21-H, $^3J\{17\text{-H}, 18\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{21\text{-H}, 22\text{-H}\} = 7.60$ Hz), 1.54 (H_2O), 1.28 (s, 6H, 16-H, 23-H), 1.00-0.97 (t, 6H, 18-H, 22-H, $^3J\{18\text{-H}, 17\text{-H}\} = 7.60$ Hz, $^3J\{22\text{-H}, 21\text{-H}\} = 7.60$ Hz).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.1 (16-C, 23-C), 12.8 (19-C, 20-C), 14.7 (18-C, 22-C), 17.2 (17-C, 21-C), 121.5 (2-C, 6-C), 130.1 (3-C, 5-C), 130.1 (7-C), 133.7 (9-C, 14-C), 136.9 (8-C, 15-C), 137.8 (10-C, 13-C), 143.0 (1-C), 148.4 (4-C), 155.1 (11-C, 12-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):



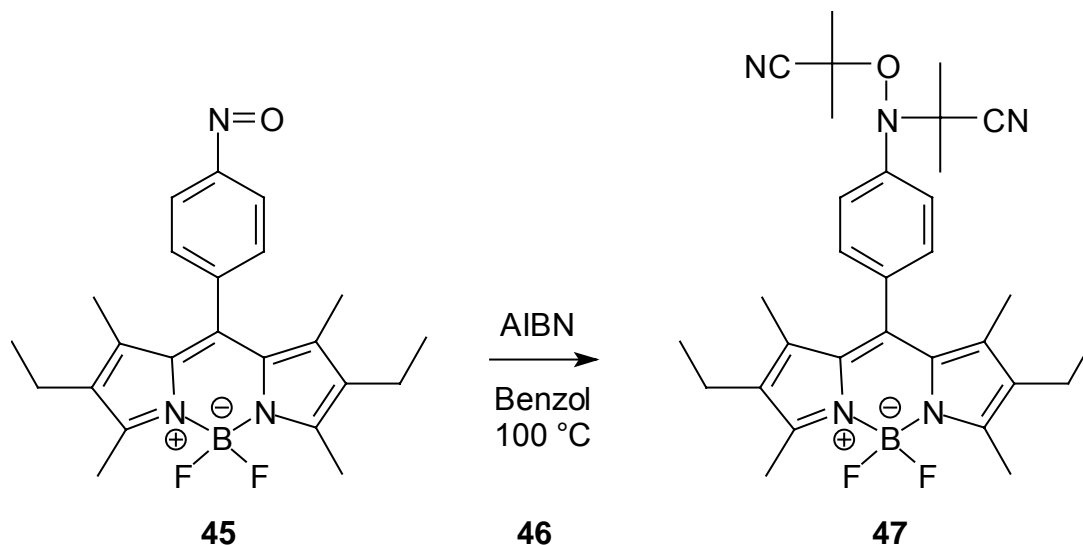
berechnet (für $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_3\text{ONa}$)	: 432.2033	[M + Na]
gefunden	: 432.2045	
Abweichung	: 2.80 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$)	: 410.2214	[M + H]
gefunden	: 410.2216	
Abweichung	: 0.50 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{BFN}_3\text{O}$)	: 390.2152	[M + H] - HF
gefunden	: 390.2170	
Abweichung	: 4.60 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{46}\text{H}_{52}\text{B}_2\text{F}_4\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}$)	: 841.4181	[2M + Na]
gefunden	: 841.4199	
Abweichung	: 2.10 ppm	

7.6.25 4,4-DIFLUORO-8-[4-NITROSO(*N,O*-DIISOBUTYRONITRIL)PHENYL]1,3,5,7-TETRAMETHYL-2,6-DIMETHYL-4-BORA-3A,4A-DIAZA-S-INDACEN (**47**)

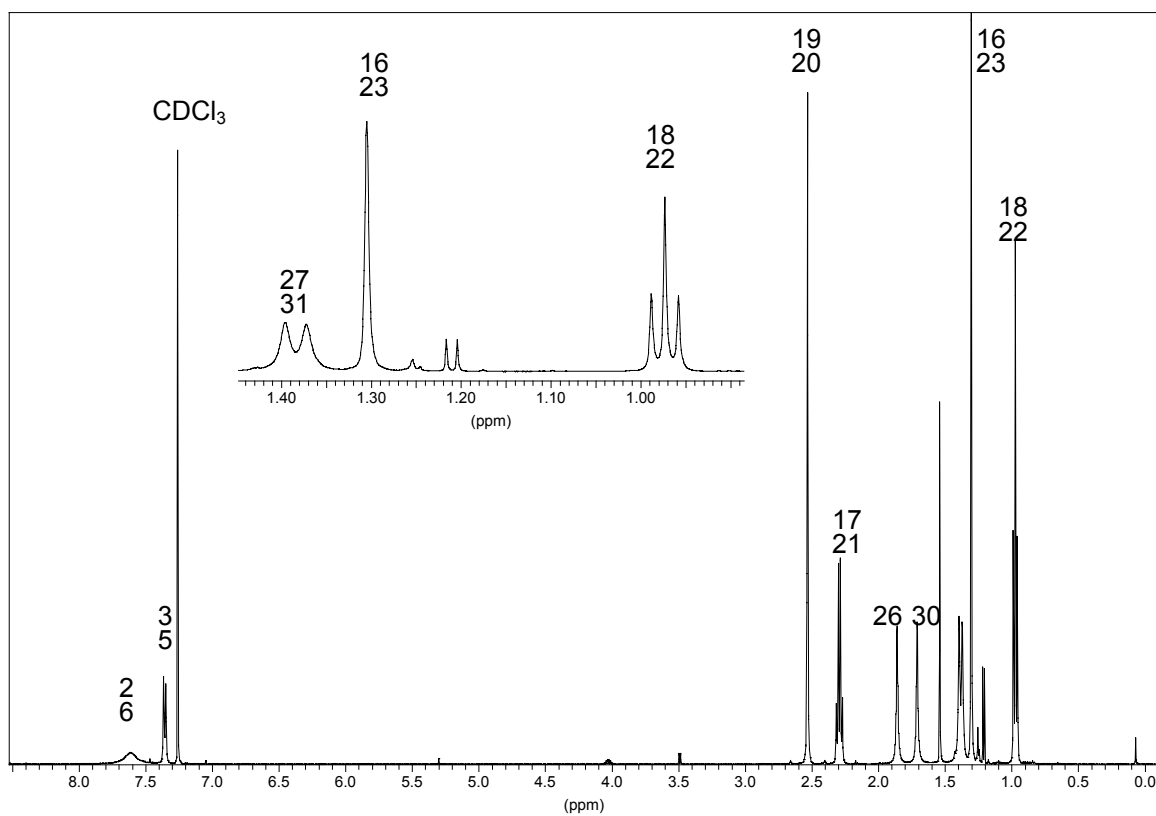
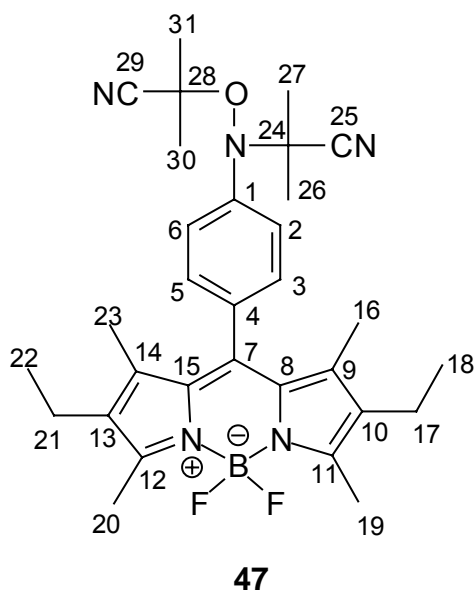


Zu einer Lösung von 120 mg (0.29 mmol) Nitroso-BODIPY **45** in 15 mL Benzol p.a. wurden unter Argon und starkem Rückfluss (Badtemperatur 100 °C) in kleinen Portionen im Abstand von 2-3 h insgesamt 487 mg (2.97 mmol) AIBN gegeben und insgesamt 30 h erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde eine Säulenchromatographie auf Kieselgel mit Dichlormethan durchgeführt ($R_f(\text{47})[\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2] = 0.33$). Der erhaltene Feststoff (221 mg) enthielt laut NMR-Analyse etwa 4.3 % Produkt und 95.7% 2,2,3,3-Tetramethylsuccinonitril. Letzteres wurde durch Sublimation im Ölpumpenvakuum bei 45 °C Badtemperatur innerhalb von 10 h weitestgehend entfernt. Das so erhaltene, zu 91 % reine Produkt wurde in 1.00 mL Methanol p.a. eine Stunde digeriert und über Nacht bei -30 °C gelagert. Der ausgefallene Feststoff wurde abzentrifugiert, mit Methanol gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 10.2 mg (0.02 mmol) Verbindung **47**, 7 %.

Schmelzpunkt: 195-197 °C

Charakterisierung:

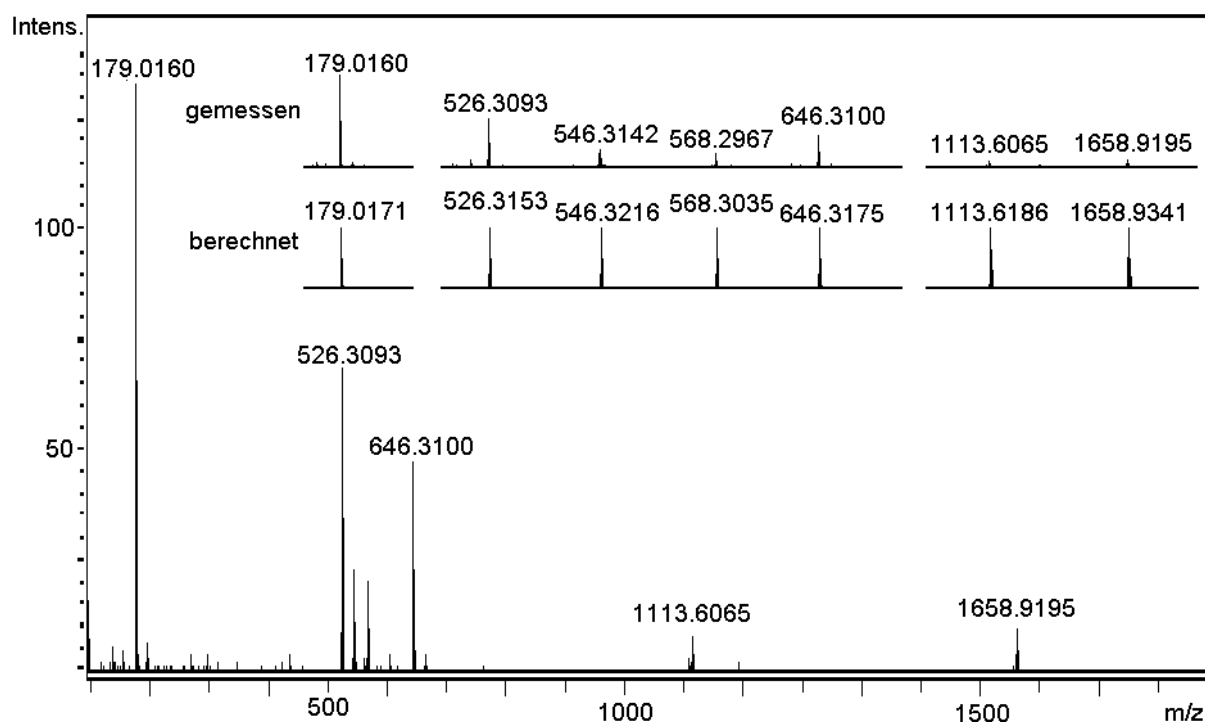


¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.61 (br s, 2H, 2-H, 6-H), 7.36-7.35 (d, 2H, 3-H, 5-H, ³J{3-H, 2-H} = 8.40 Hz, ³J{5-H, 6-H} = 8.40 Hz), 2.53 (s, 6H, 19-H, 20-H), 2.32-2.27 (q, 4H, 17-H, 21-H, ³J{17-H, 18-H} = 7.55 Hz, ³J{21-H, 22-H} = 7.55 Hz), 1.86 (s, 3H, 26-H), 1.71 (s, 3H, 30-H), 1.40 (s, 3H, 31-H), 1.37 (s, 3H, 27-H), 1.31 (s,

6H, 16-H, 23-H), 0.99-0.96 (t, 6H, 18-H, 22-H, $^3J\{18\text{-H}, 17\text{-H}\} = 7.55 \text{ Hz}$, $^3J\{22\text{-H}, 21\text{-H}\} = 7.55 \text{ Hz}$).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 12.0 (16-C, 23-C), 12.7 (19-C, 20-C), 14.7 (18-C, 22-C), 17.2 (17-C, 21-C), 26.1 (27-C), 26.6 (31-C), 27.1 (30-C), 27.4 (26-C), 60.9 (24-C), 75.9 (28-C), 119.9 (29-C), 120.7 (25-C), 126.2 (7-C), 129.2 (3-C, 5-C), 130.7 (8-C, 15-C), 133.2 (10-C, 13-C), 136.1 (2-C, 6-C), 138.1 (9-C, 14-C), 138.9 (1-C), 148.3 (4-C), 154.2 (11-C, 12-C).

HR-MS (ESI, *positive ion mode*, Methanol):



berechnet (für $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{BFN}_5\text{O}$)	: 526.3153	$[\text{M} + \text{H}] - \text{HF}$
gefunden	: 526.3093	
Abweichung	: 11.4 ppm	

berechnet (für $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}$)	: 546.3216	$[\text{M} + \text{H}]$
gefunden	: 546.3142	
Abweichung	: 13.5 ppm	

berechnet (für $C_{31}H_{38}BF_2N_5ONa$)	: 568.3035	[M + Na]
gefunden	: 568.2967	
Abweichung	: 12.0 ppm	
berechnet (für $C_{33}H_{44}BF_2N_5O_2SNa$)	: 646.3175	[M + Na + DMSO]
gefunden	: 646.3100	
Abweichung	: 11.6 ppm	
berechnet (für $C_{62}H_{76}B_2F_4N_{10}O_2Na$)	: 1113.6186	[2M + Na]
gefunden	: 1113.6065	
Abweichung	: 10.9 ppm	
berechnet (für $C_{93}H_{114}B_3F_6N_{15}O_3Na$)	: 1658.9341	[3M + Na]
gefunden	: 1658.9195	
Abweichung	: 8.80 ppm	
berechnet (für $C_4H_{12}O_2S_2Na$)	: 179.0171	[2DMSO + Na]
gefunden	: 179.0160	
Abweichung	: 6.15 ppm	

7.7 Untersuchung der Fluoreszenzsonden im zellfreien System

7.7.1 ESR-SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

Für die ESR-spektroskopischen Untersuchungen wurden 1-10 mM Stammlösungen des jeweiligen Nitrons bzw. der Nitrosoverbindung verwendet. Die Konzentration der zur Messung verwendeten Proben betrug 0.5-5 mM des Radikalfängers. Vor der Messung wurden die Proben eine Minute mit Argon gespült. Anschließend wurden die entsprechenden Zusätze zur Erzeugung von Superoxid-, OH-, CH_2OH -, Methyl- bzw. Isobutyronitril-Radikale zugegeben. Für den Abfang von Superoxid-Radikalanionen wurde der Feststoff Kaliumsuperoxid in ca. 200fachem Überschuss zugesetzt. Der Abfang von OH-Radikalen erfolgte durch Zugabe von jeweils

1-10 mM Eisen(II)-chlorid-Lösungen und Wasserstoffperoxid-Lösungen (Fenton-Reaktion). Das jeweilige Verhältnis Fänger/ H_2O_2 /Fe(II) ist dem Abschnitt 4.3 zu entnehmen. Die Erzeugung von CH_2OH -Radikalen und CH_3 -Radikalen erfolgte durch Zusatz von Methanol bzw. DMSO zu dem OH-Radikal generierenden System (Fenton). Isobutyronitril-Radikale wurden in Benzol aus Azoisobutyronitril durch Photolyse erzeugt. Das Verhältnis Fänger/AIBN betrug 1/10. Die Geräteeinstellungen der jeweiligen Messung sind dem Abschnitt 4.3 zu entnehmen. Die aufgeführten Kopplungskonstanten wurden durch Simulation der gemessenen Spektren mit der Software NIEHS WinSim EPR (Version 0.95) erhalten, indem die aus den Spektren entnommenen Kopplungskonstanten optimiert wurden. Die g-Werte wurden den gemessenen Spektren entnommen.

7.7.2 ANALYSE DES FLUORESZENZVERHALTENS VOR UND NACH RADIKALABFANG

Zur Aufnahme von Absorptions- und Fluoreszenzspektren im zellfreien System wurden zunächst Stammlösungen (1 mM) der Fänger angefertigt. Diese wurden zur Herstellung von 10 μM Messlösungen verwendet (Ausnahme: Verbindung **23**, 5 μM Messlösung). Die Aufnahme der Spektren erfolgte unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 22 °C. Die Generierung von Superoxid-, OH-, CH_2OH -, bzw. Methyl-Radikalen erfolgte wie unter Abschnitt 7.7.1 beschrieben. Die Erzeugung von Isobutyronitril-Radikalen erfolgte thermisch bei 100 °C (Badtemperatur), da die Farbstoffe durch Photolyse zerstört wurden. Das jeweilige Verhältnis Fänger/Radikal ist dem Abschnitt 4.3 zu entnehmen.

7.7.3 UNTERSUCHUNG DER REDUKTIONSEMPFINDLICHKEIT

Die potentiellen Fluoreszenzsonden **41** und **45** wurden mittels kontinuierlicher Fluoreszenzmessung hinsichtlich ihrer Reduktionsempfindlichkeit untersucht. Die Messungen wurden auf 96wells durchgeführt (Endvolumen: 300 μL /Probe). Es wurden 10 mM Stammlösungen der Reduktionsmittel Ascorbinsäure, NADH, Glutathion und Glucose in Imidazolpuffer (pH 7.20) angesetzt und diese auf 200 μM verdünnt. Diese Lösung wurde in unterschiedlichen Mengen in die Messkammern

pipettiert (Endkonzentrationen: 0.00, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0, 50.0, 100 μ M Reduktionsmittel). Zur Eisenchelatisierung wurde ferner eine 10 mM Stammlösung von Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) in einer 20 mM Natronlauge angefertigt und diese auf 2 mM in Imidazolpuffer aliquotiert. Zur Erreichung einer Endkonzentration von 100 μ M wurden 15 μ L der 2 mM Lösung in eine Messkammer mit 100 μ M Ascorbinsäurelösung pipettiert. Die Kammern wurden mit Imidazolpuffer (pH 7.20) bis auf 270 μ L aufgefüllt. Von den Fluoreszenzsonden **41** und **45** wurden jeweils 2.5 mM Stammlösungen in DMSO angefertigt und diese in Imidazolpuffer (pH 7.20) aliquotiert (100 μ M). Davon wurden jeweils 30 μ L in die Messkammern gegeben und die kontinuierliche Fluoreszenzmessung direkt im Anschluss begonnen. Es wurde bei einer Temperatur von 37 °C gemessen. Vor jeder Messung fand eine automatische Durchmischung der Kammern statt.

7.8 Untersuchung der Fluoreszenzsonden im zellulären System

7.8.1 ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN LÖSUNGEN

Desferal-Lösung:

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 33 mg Desferal in 250 μ L Wasser gelöst. Die Lösung ist einen Tag bei 4 °C haltbar.

Eisen(III)/8-Hydroxychinolin-Komplex:

Die Stammlösung wurde durch lösen von 14.5 mg 8-Hydroxychinolin in 5.00 mL DMSO (0.02 M) und anschließender Zugabe von 13.5 mg Eisen(III)-chlorid (0.01 M) hergestellt. Die Lösung wurde am Tag der Messung frisch hergestellt.

Glucoseoxidase-Lösung:

Zur Herstellung der Stammlösung (20000 U/L) wurden 0.10 mg GOD in 1000 μ L Wasser gelöst. Die Stammlösung wurde einen Tag verwendet und bei 4 °C gelagert.

Hanks' balanced salt solution (HBSS, pH = 7.35):

Das Wasch- und Inkubationsmedium wurde aus 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 1.26 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.41 mM MgSO₄, 0.34 mM Na₂HPO₄, 25.0 mM 2[4-(2-Hydroxy-ethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure (HEPES) in Wasser hergestellt.

Imidazolpuffer (pH 7.20):

Für eine 10 mM Pufferlösung wurden 34.0 mg Imidazol in 50.0 mL Wasser gelöst und über Nacht mit 2.00 g Chelex bei 4 °C gelagert. Nach abdekantieren der Lösung wurde der pH-Wert mit 0.1 M Salzsäure bzw. 0.1 M Natronlauge eingestellt.

Der Imidazolpuffer ist bei 4 °C mehrere Wochen haltbar.

Kaliumcyanid-Lösung:

Die 200 mM Stammlösung wurde durch Lösen von 3.79 mg KCN in 291 µL HBSS hergestellt. Die Lösung ist bei 4 °C mehrere Wochen haltbar.

Krebs-Henseleit-Puffer (KH-Puffer):

115 mM NaCl, 25.0 mM NaHCO₃, 5.90 mM KCl, 1.20 mM MgCl₂, 1.20 mM NaH₂PO₄, 1.20 mM Na₂SO₄, 2.50 mM CaCl₂, 20 mM Hepes. Die Einstellung des pH-Wertes auf 7.35 erfolgte mit 0.1 M Salzsäure bzw. 0.1 M Natronlauge. Haltbar bei 4 °C.

KH(198 mM His)-Puffer:

618 mg L-Histidin wurden in 20.0 mL KH-Puffer (pH 7.35) im Ultraschallbad gelöst. Der KH(His)-Puffer wurde am Tag der Messung frisch hergestellt.

Menadion-Lösung:

Die 6 mM Stammlösung wurde hergestellt, indem 1.70 mg 2-Methyl-1,4-naphtochinon in 1646 µL DMSO gelöst wurden. Die Lösung wurde über zwei Wochen verwendet (Lagerung bei 4 °C).

Pluronic (Löslichkeitsvermittler):

30 % in DMSO. Mehrere Wochen bei –30 °C haltbar.

TBA-Test: Lösungen für die Kalibrierungsgerade

Als Standardsubstanz für die Kalibrierung wurde 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (Malonaldehyd-tetramethylacetat) verwendet. Zur Herstellung einer 6.04 mM Stammlösung (SL) wurden 100 μ L 1,1,3,3-Tetramethoxypropan in 100 mL Wasser gelöst. Durch Aliquotierung wurden vier verschiedene Lösungen zur Erstellung der Kalibrierungsgeraden hergestellt:

Lösung A (1.21 μ M): 20.0 μ L SL wurden mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

Lösung B (3.02 μ M): 50.0 μ L SL wurden mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

Lösung C (6.04 μ M): 100.0 μ L SL wurden mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

Lösung D (12.08 μ M): 200.0 μ L SL wurden mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

Die Lösungen A bis D sowie die Stammlösung sind bei 4 °C mehrere Wochen haltbar.

tert.-Butylhydroperoxid-Lösung:

Zur Herstellung einer 40 mM Stammlösung wurden 5.72 μ L einer 70 proz. *tert.*-Butylhydroperoxid-Lösung in 994 μ L KH-Puffer (ohne Bicarbonat) gegeben. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert und über zwei Wochen verwendet.

Thiobarbitursäure (1 %):

1.00 g Thiobarbitursäure wurden in 20.0 mL 1 M Natronlauge gelöst und anschließend mit 1.0 M und 0.1 M Salzsäure bzw. 0.1 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 7.00 eingestellt. Die Lösung wurde mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Die Haltbarkeit ist bei einer Lagerung im Kühlschrank (4 °C) mehrere Wochen gegeben.

Trichloressigsäure (30 %):

30.0 g Trichloressigsäure wurden in 70.0 g Wasser gelöst. Die Lösung ist bei 4 °C mehrere Wochen haltbar.

7.8.2 ZELLPRÄPARATION UND ZELLKULTIVIERUNG

Die Präparation und Kultivierung der Zellen wurden freundlicherweise von Frau Birgit Lammers und Frau Nathalie Boschenkov (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt.

7.8.2.1 Präparation und Kultivierung von Rattenhepatozyten

Die Hepatozytenisolation erfolgte nach der von de Groot et al.^[91] beschriebenen Methode. Die Hepatozyten wurden mit einer Dichte von 2.40×10^5 Zellen/cm² (ermittelt mit einer Neubauer-Zählkammer, Brand, Wertheim/Main, Deutschland) auf kollagenbeschichteten Petrischalen und Zellkulturflaschen eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in L-15 Medium, ergänzt mit fötalem Kälberserum (5.0 %), L-Glutamin (2.0 mM), Glukose (8.3 mM), Rinderserumalbumin (0.1 %), Natriumhydrogencarbonat (14.3 mM), Gentamicin (50 µg/mL) und Dexamethason (1.0 µM) bei einer Temperatur von 37 °C in einer Atmosphäre von 5.00 % CO₂ / 95.0 % Raumluft mit einer Luftfeuchtigkeit von 100 % (Brutschrank Modell 6000, Heraeus, Hanau, Deutschland). Zwei Stunden nach dem Einsetzen wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und für weitere 20 - 24 Stunden bis zum Beginn der Experimente kultiviert.

7.8.2.2 Kultivierung der Mausfibroblasten

Die Zellen der Murin Fibroblasten Zelllinie L929 wurden in *Eagle's minimal essential-Medium* kultiviert, welches mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin ergänzt wurde. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37 °C (5.00 % CO₂ / 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %). Die Subkultivierung erfolgte durch Behandlung mit Trypsin (0.25 % (v/v) Trypsin in Citratsalzlösung). Für die Messungen wurden die Zellen mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² in 24well-Petrischalen über 48 h kultiviert.

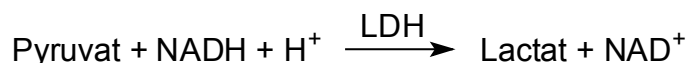
7.8.3 ERMITTLUNG DER ZELLULÄREN INDIKATORKONZENTRATION

Zur Bestimmung der zellulären Konzentration des Indikators **45** (6 Zellkulturflaschen, 2fach-Bestimmung) wurden die in Zellkulturflaschen kultivierten Hepatozyten mit HBSS gewaschen und mit 2.50 mL KH-Puffer (pH 7.35, bicarbonathaltiges Medium) versetzt. Dazu wurden 17 µL Pluronic (30 % in DMSO) und 8 µL DMSO in die zwei Zellkulturflaschen der Lösungsmittelkontrolle gegeben. Zur Erreichung einer Beladungskonzentration von 10 bzw. 50 µM **45** wurden in weitere 4 Flaschen jeweils

17 μL Pluronic (30 % in DMSO) in den Überstand der Flaschen gegeben und anschließend jeweils 8 μL einer 3 mM bzw. 15 mM Stammlösung der Verbindung **45** in DMSO pipettiert. Die zellfreien Lösungen wurden analog in Eppendorf-Cups angesetzt und zusammen mit den präparierten Zellkulturflaschen drei Stunden bei einer Temperatur von 37 °C (5.00 % CO_2 / 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %) inkubiert. Anschließend wurden die mit 10 bzw. 50 μM **45** beladenen Zellüberstände abpipettiert und UV/Vis-spektroskopisch untersucht ($\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$). Die adhärenenten Hepatozyten wurden vorsichtig dreimal mit HBSS gewaschen und anschließend mit Ethanol/0.40 % SDS fünf bis zehn Minuten lysiert. Das Zelllysats wurde fünf Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert und ebenfalls UV/Vis-spektroskopisch untersucht. Die zellfreien Ansätze mit 10 und 50 μM **45** in KH-Puffer dienten zur UV/Vis-spektroskopischen Bestimmung von $\log \varepsilon$. Der zellfreie Ansatz mit KH-Puffer, DMSO und Pluronic wurde als Leerwert bei der UV/Vis-Spektroskopie verwendet. Lediglich die Messung des Zelllysats erfolgte gegen Ethanol/0.40 % SDS.

7.8.4 VITALITÄTSBESTIMMUNG

Das Enzym Lactat-Dehydrogenase (LDH) ist nicht membranpermeabel, so dass ein Austritt von LDH in den Extrazellulärraum als indirekter Nachweis für die Zerstörung der Zellmembranen und damit für den Zelltod gilt. Aufgrund dessen wurde zur Vitalitätsbestimmung die LDH-Menge im Inkubationsmedium bestimmt. Zunächst wurden die in Zellkulturflaschen (8 Flaschen für 2fach-Bestimmungen) kultivierten Hepatozyten mit 2.50 mL KH-Puffer, mit 2.50 mL KH-Puffer/0.20 % Pluronic und 10 bzw. 50 μM **45** sowie als Lösungsmittelkontrolle mit 2.50 mL KH-Puffer und DMSO (1 %) / Pluronic (0.20 %) beladen. Bei dem Schädigungsmodell L-Histidin wurde der KH-Puffer mit L-Histidin (198 mM) versetzt. Zur Schädigung durch Erhöhung der Eisen(II)-Konzentration in der Zelle wurde dem KH-Puffer 4 μL der Komplexlösung Fe(III)/8-HQ (siehe Abschnitt 7.8.1, Endkonzentration: 15 μM /30 μM) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C (5.00 % CO_2 / 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %). Es wurde stündlich jeweils eine Probe (200 μL) des Inkubationsmediums entnommen, mit 600 μL HBSS verdünnt und titrimetrisch die LDH-Menge indirekt über die Abnahme der NADH-Konzentration nach der Umsetzung von



bestimmt. Die Messung erfolgte photometrisch über die Abnahme der Extinktion von NADH bei 334 nm. Da die LDH-Aktivität außer vom Grad der Schädigung auch von der Menge der eingesetzten Zellen abhängig ist, wurden die Zellen am Ende des Versuches (nach fünf Stunden) zur Bestimmung der insgesamt in ihnen enthaltenen LDH (Gesamt-LDH) mit dem Detergens Triton lysiert. Dieses Vorgehen erlaubt die Bestimmung der relativen LDH-Freisetzung in % als Maß des Zellschädigungsgrades:

$$\text{LDH-Freisetzung (\%)} = \frac{\text{freigesetzte LDH}}{\text{Gesamt LDH}} \times 100 \quad (13)$$

Die indirekte Titration von LDH erfolgte mittels Analysenautomaten (siehe Abschnitt 7.1) bei 37 °C.

7.8.5 SUBZELLULÄRE VERTEILUNG DES FARBSTOFFES

Zur Analyse der subzellulären Verteilung des Farbstoffes **45** wurden Deckgläschen mit adhärenen Hepatozyten in Petrischalen mit 2.00 mL KH-Puffer, 13 µL Pluronic (30 % in DMSO) und 10 µL BDPNO **45** (2 mM Stammlösung in DMSO) beladen. Die Zellen wurden zwei Stunden bei 37 °C (5.00 % CO₂ / 95.0 % Raumluft, 100 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Deckgläschen in eine Pentz-Kammer eingeschraubt, die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und mit 2.00 mL HBSS bedeckt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Laser-Scanning-Mikroskop (37 °C) bei $\lambda_{\text{exc}} = 510 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \geq 560 \text{ nm}$ unter Verwendung des Objektivs 63 x NA 1.40 Plan-Apochromat/Oil.

7.8.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR EIGNUNG ALS RADIKALSONDE IM ZELLULÄREN SYSTEM

Die Untersuchungen wurden mittels kontinuierlicher Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Die Messungen erfolgten automatisch mit dem Gerät Fluorostar Optima der Firma BMG Labtech bei 37 °C. Verwendet wurden 6wells mit adhärenenten Hepatozyten (Primärkultur) und 24wells mit Fibroblasten (Zelllinie L929). In die 6wells wurde jeweils 2.00 mL, in die 24wells 1.00 mL Inkubationsmedium pro Kammer gegeben. Zur Erreichung von 0.20 % Pluronic (Endkonzentration) wurden den Lösungen in den 6wells 13.0 µL und in den 24wells 6.70 µL Pluronic (30 %) zugesetzt. Für Endkonzentrationen der Radikalsonde **45** von 2, 10 und 50 µM wurden Stammlösungen von 1 bis 13.5 mM der Verbindung **45** in DMSO verwendet. Für die Schädigung mit L-Histidin wurde KH(His)-Puffer (siehe Abschnitt 7.8.1) eingesetzt.

Zur Erreichung der für die Vorinkubation mit Desferal nötigen Konzentration von 10 mM wurden 50.0 µL der Desferal-Stammlösung (siehe Abschnitt 7.8.1) in 1000 µL des Nährmediums gegeben und bei 37 °C (5.00 % CO₂ / 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %) 30 Minuten vorinkubiert.

Zur Erhöhung der Eisen(II)-Konzentration in den Zellen wurde in die Kammern der 6wells zur Erreichung einer Endkonzentration (EK) von 15 µM Fe(III) / 30 µM 8-HQ jeweils 3.20 µL des Fe(III)/8-HQ-Komplexes (siehe Abschnitt 7.8.1) gegeben. Für die gleiche EK wurde in die Kammern der 24wells 1.60 µL des Komplexes gegeben bzw. 3.20 µL für eine EK von 30 µM Fe(III) / 60 µM 8-HQ.

Die Konzentration der verwendeten Kaliumcyanid-Stammlösung betrug 200 mM in HBSS-Lösung. Ferner wurde eine 6 mM Menadion-Stammlösung in DMSO und eine 40 mM *tert.*-Butylhydroperoxid-Stammlösung in KH-Puffer verwendet. Für eine EK von 1.00 mM KCN, 30.0 µM Menadion bzw. 200 µM tBOOH wurden in die 6wells (Hepatozyten) von der KCN- und der Menadion-Stammlösung jeweils 10 µL, in die 24wells (Fibroblasten) von der KCN-, der Menadion- und der tBOOH-Stammlösung jeweils 5 µL gegeben (Stammlösungen siehe Abschnitt 7.8.1).

Zur Erreichung einer EK von 10 mM D-Glucose wurden 45.0 mg D-Glucose in 25.0 mL KH-Puffer gelöst und jeweils 1.00 mL dieser 10 mM D-Glucose-Lösung in die Kammern der 24wells pipettiert. Ferner wurden für 50 U/L bzw. 100 U/L GOD 2.5 µL bzw. 5 µL der GOD-Stammlösung (siehe Abschnitt 7.8.1) in die Kammern der 24wells gegeben.

Bei allen Untersuchungen wurde der Farbstoff **45** zuletzt zugegeben und die Messung unverzüglich nach dieser Zugabe gestartet.

7.8.7 LIPIDPEROXIDATION (MDA-TEST)

Aufgrund der Doppelbestimmungen wurden insgesamt 12 Zellkulturflaschen mit kultivierten Hepatozyten nach Entfernung des Nährmediums dreimal mit HBSS gewaschen. In jede Flasche wurden 2.50 mL KH-Puffer gegeben und anschließend wurden vier der Flaschen mit 16.7 µL Pluronic (30 %) und 12.5 µL BDPNO **45** (2 mM DMSO-Stammlösung) versetzt. Für die Lösungsmittelkontrolle wurden in weitere vier Flaschen 16.7 µL Pluronic (30 %) und 12.5 µL DMSO gegeben. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen bei 37 °C (5.00 % CO₂/ 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %) eine Stunde vorinkubiert. Die Überstände wurden abgesaugt und die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen. Jeweils zwei Zellkulturflaschen, die mit KH-Lösung vorinkubiert wurden, zwei mit BDPNO **45** vorinkubierte Flaschen sowie zwei Lösungsmittelkontrollen wurden mit 2.50 mL KH-Puffer versetzt. Die weiteren sechs Zellkulturflaschen, die bis zum Waschen mit HBSS identisch behandelt wurden, wurden statt mit KH-Puffer mit 2.50 mL KH(His)-Puffer (siehe Abschnitt 7.8.1) versetzt. Die Zellkulturflaschen wurden weitere vier Stunden bei 37 °C (5.00 % CO₂/ 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %) inkubiert. Während dieser Zeit wurden stündlich Proben (100 µL, mit 300 µL HBSS verdünnt) für die Vitalitätsbestimmung entnommen, da hier im Vergleich zu den in Abschnitt 7.8.4 beschriebenen Vitalitätsbestimmungen veränderte Bedingungen vorlagen (Vorinkubation mit Verbindung **45** und anschließende Entfernung aus dem Inkubationsmedium). Im Anschluss an die Inkubation wurden jeweils 1.00 mL des Zellüberstandes abpipettiert und mit 0.20 mL Trichloressigsäure (4 °C, siehe Abschnitt 7.8.1) versetzt. Ferner wurden die Kalibrierungs-Lösungen A bis D des TBA-Tests (siehe Abschnitt 7.8.1) mit 0.20 mL Trichloressigsäure gemischt. Zudem wurden zur Herstellung des Reagenzienleerwertes 1.00 mL Wasser und für den Probenleerwert 1.00 mL KH-Puffer (Pluronic (0.20 %) / DMSO (1.00 %)) mit 0.20 mL Trichloressigsäure versetzt. Die Proben wurden bei 3000 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde jeweils 1.00 mL des Überstandes mit 0.50 mL Thiobarbitursäure-Lösung (siehe Abschnitt 7.8.1) in ein Reagenzglas gegeben,

verschlossen und die Mischung für zehn Minuten im Wasserbad bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden zentrifugiert (5 Minuten bei 3000 U/min) und UV/Vis-spektroskopisch bei 532 nm gemessen. Abbildung 7-1 zeigt die Kalibrierungsgerade.

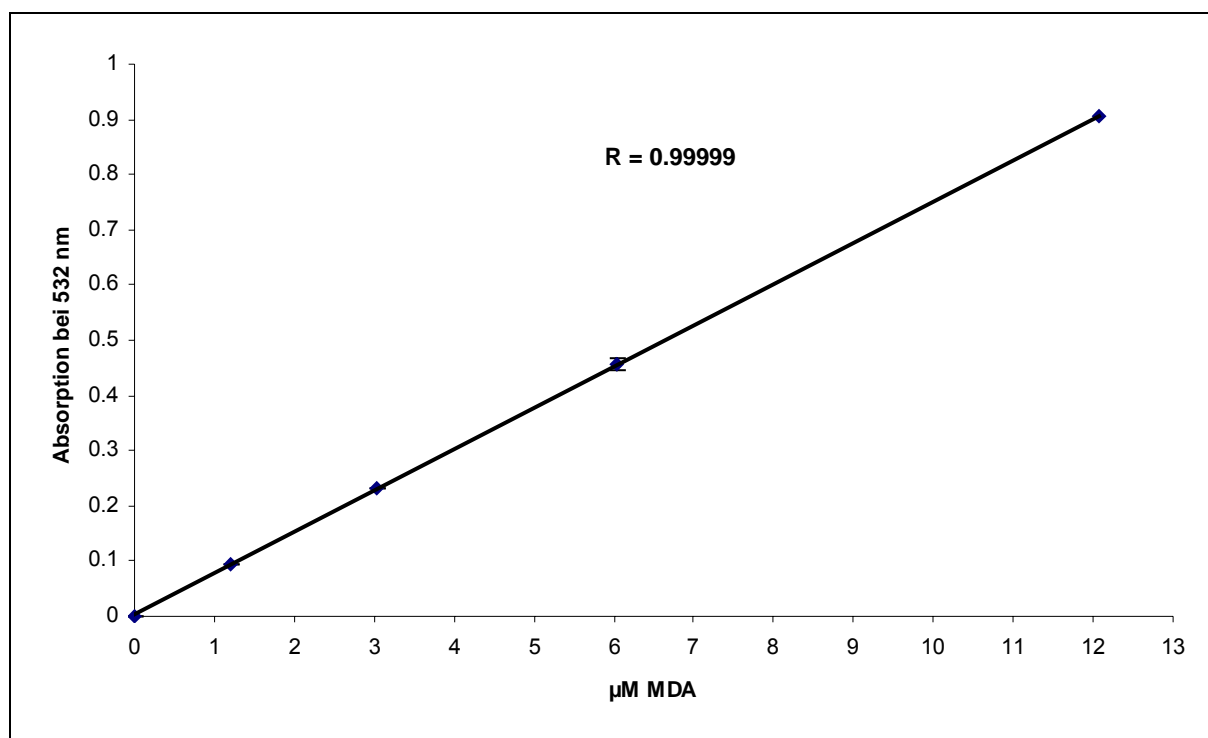


Abbildung 7-1: Kalibrierungsgerade des Thiobarbitursäure-Tests.

Des weiteren wurde ein möglicher Austritt der Verbindung **45** während der vierstündigen Inkubation untersucht. Dafür wurden nach der Inkubation 800 µL des Zellüberstandes abpipettiert und UV/Vis-spektroskopisch untersucht. Es zeigte sich, das Verbindung **45** nicht austritt.

8 LITERATUR

- [1] G. Löffler, P. Petrides, , *Biochemie & Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer-Verlag, **2003**.
- [2] D. Wallace, *Ment. Retard. Dev. Disabil.* **2001**, 158.
- [3] R. S. Davidson, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1983**, 19, 1.
- [4] E. T. Denisov, I. V. Khudyakov, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1313.
- [5] T. Mill, D. G. Hendry, H. Richardson, *Science* **1980**, 207, 886.
- [6] G. W. Burton, K. U. Ingold, *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 194.
- [7] N. A. Porter, *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 262.
- [8] R. P. Mason, *Spin Labelling in Pharmacology*, Academic Press: New York, **1984**.
- [9] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, , *Physiol. Rev.* **1979**, 59, 527.
- [10] W. H. Koppenol, , *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, 15, 645.
- [11] A. Rigo, R. Stevenato, A. Finazzi-Agro, G. Rotilio, , *FEBS-Letters* **1977**, 80, 130.
- [12] C. Ferradini, J. Foos, , *Photochem. Photobiol.* **1978**, 28, 697.
- [13] W. H. Melhuish, H. C. Sutton, , *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 970.
- [14] J. Weinstein, B. H. J. Bielski, , *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 58.
- [15] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, , *Methods Enzymol.* **1990**, 1.
- [16] M. K. Shigenaga, T. M. Hagen, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 10771.
- [17] M. K. Shigenaga, B. N. Ames, *Basic Life Sci.* **1993**, 61, 419.
- [18] B. Frey, L. England, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 6377.
- [19] C. von Sonntag, H. P. Schuchmann, , *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1255.
- [20] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, , *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3. Auflage, Oxford University Press (Clarendon) Oxford, **2000**.
- [21] W. Dröge, , *Physiol. Rev.* **2002**, 82, 47.
- [22] R. A. Floyd, J. J. Watson, P. K. Wong, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, 10, 221.
- [23] H. Kaur, B. Halliwell, *Methods Enzymol.* **1994**, 233, 67.
- [24] C. Caudray, M. Talla, S. Martin, M. Fatome, A. Favier, *Anal. Biochem.* **1995**, 227, 101.

-
- [25] N. V. Blough, R. G. Zepp, *Active Oxygen in Chemistry*, Chapman and Hall, New York, **1995**.
- [26] J.-Z. Sun, H. Kaur, B. Halliwell, X.-Y. Li, R. Bolli, *Circ. Res.* **1993**, 73, 534.
- [27] E. G. Janzen, *Acc. Chem. Res.* **1971**, 4, 31.
- [28] M. J. Perkins, *Adv. Phys. Org. Chem.* **1980**, 17, 1.
- [29] E. G. Janzen, *Methods Enzymol.* **1984**, 105, 188.
- [30] A. Samuni, C. M. Krishna, P. Riesz, E. Finkelstein, A. Russo, *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, 6, 141.
- [31] A. Y. Samuni, A. Samuni, H. M. Swartz, *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, 6, 179.
- [32] E. Finkelstein, G. M. Rosen, E. J. Rauckman, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 4994.
- [33] S. Rokushika, H. Taniguchi, H. Hatano, *Anal. Lett.* **1975**, 8, 205.
- [34] K. Makino, F. Moriya, H. Hatano, *J. Chromatogr.* **1985**, 332, 71.
- [35] E. G. Janzen, *Free Radicals in Biology*, Academic Press, New York, **1980**.
- [36] E. Finkelstein, G. M. Rosen, *Adv. Free Radical Biol. Med.* **1985**, 1, 345.
- [37] S. Pou, D. J. Hassett, B. E. Britigan, M. S. Cohen, G. M. Rosen, *Anal. Biochem.* **1989**, 177, 1.
- [38] S. Pou, Y.-I. Huang, A. Bhan, V. S. Bhadti, R. S. Hosmane, S. Y. Wu, G.-L. Cao, G. M. Rosen, *Anal. Biochem.* **1993**, 212, 85.
- [39] N. V. Blough, D. J. Simpson, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 1915.
- [40] D. J. Kieber, N. V. Blough, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2275.
- [41] B. Li, P. L. Gutierrez, N. V. Blough, *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4295.
- [42] G. Moad, D. A. Shipp, T. A. Smith, D. H. Solomon, *Macromolecules* **1997**, 30, 7627.
- [43] S. E. Herbelin, N. V. Blough, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 8170.
- [44] T. Kalai, E. Hideg, I. Vass, K. Hideg, *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, 24, 649.
- [45] E. Lozinsky, V. V. Martin, T. A. Berezina, A. I. Shames, A. L. Weis, G. I. Likhtenshtein, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, 38, 29.
- [46] G. Moad, D. A. Shipp, T. A. Smith, D. H. Solomon, *J. Phys. Chem. A* **1999**, 103, 6580.
- [47] E. Lozinsky, A. I. Shames, G. I. Likhtenshtein, *Recent Res. Devel. Photochem. & Photobiol.* **2001**, 5, 41.
- [48] C. Coenjarts, O. Carcia, L. Llauger, J. Palfreyman, A. L. Vinette, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 620.

- [49] S. Pou, A. Bhan, V. S. Bhaddi, S. Y. Wu, R. S. Hosmane, G. M. Rosen, *FASEB J.* **1995**, 9, 1085.
- [50] L. Holleck, *Naturwissenschaften* **1952**, 39, 159.
- [51] K. Chabita, P. C. Mandal, , *Ind. J. Chem. A* **2002**, 41, 2231.
- [52] B. Tuccio, P. Bianco, J. C. Bouteiller, P. Tordo, , *Electrochimica Acta* **1999**, 44, 4631.
- [53] A. Mayer, S. Neuenhofer, , *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1097.
- [54] G. Kortüm, , *Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie*, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, **1962**.
- [55] W. Schmidt, , *Optische Spektroskopie, Eine Einführung, Vol. 2. Auflage*, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [56] I. L. Medintz, K. E. Sapsford, L. Berti, , *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4676.
- [57] U. Schobel, H. J. Egelhaaf, A. Brecht, D. Oelkrug, G. Gauglitz, , *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 1107.
- [58] M. P. Lillo, B. K. Szpikowska, M. T. Mas, J. D. Sutin, J. M. Beechem, , *Biochemistry* **1997**, 36, 11273.
- [59] J. R. Lakowicz, , *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2 ed., Kluwer/Plenum, New York, **1999**.
- [60] S. A. Latt, H. T. Cheung, E. R. Blout, , *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 877, 996.
- [61] L. Stryer, R. P. Haugland, , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, 58, 719.
- [62] G. Gabor, , *Biopolymers* **1968**, 6, 809.
- [63] R. P. Haugland, J. Yguerabide, L. Stryer, , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, 63, 23.
- [64] F. Petrat, H. de Groot, R. Sustmann, U. Rauen, , *Biol. Chem.* **2002**, 383, 489.
- [65] R. Bandichhor, A. D. Petrescu, A. Vespa, A. B. Kier, F. Schroeder, K. Burgess, , *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10688.
- [66] <http://www.aldrich.de>, **Aldrich, Fluoreszenzindikatoren**.
- [67] M. Colonna, L. Greci, M. Poloni, , *J. Heterocyclic Chemistry* **1980**, 17, 1473.
- [68] C. W. Muth, J. C. Ellers, O. F. Folmer, , *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 6500.
- [69] J. Houben, T. Weyl, , *Organische Stickstoffverbindungen I, Vol. E16a/1*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, **1990**.
- [70] P. J. Baldry, , *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 9, 2027.
- [71] T. Ueno, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, , *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10640.

- [72] H. G. O. Becker, W. Berger, G. Domschke, , *Organikum*, 20 ed., VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften Berlin, **1981**.
- [73] M. Mori, K. Tonogaki, N. Nishiguchi, , *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 224.
- [74] H. Lund, A. Berg, *Mathematisk-fysiske Meddelelser. XIX* **1941**, 5, 1.
- [75] J. L. Bricks, A. Kovalchuk, C. Trieflinger, M. Nofz, M. Büschel, A. I. Tolmachev, J. Daub, K. Rurack, , *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13522.
- [76] Y. Gabe, , *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3357.
- [77] D. L. Haire, U. M. Oehler, P. H. Krygsman, E. G. Janzen, , *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 4535.
- [78] E. G. Janzen, U. M. Oehler, D. L. Haire, Y. Kotake, , *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6858.
- [79] E. G. Janzen, G. A. Coulter, , *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 1962.
- [80] H. B. Stegmann, F.-M. Schaber, P. Schuler, K. Scheffler, , **1989**, 27, 887.
- [81] K. Torssell, , *Tetrahedron* **1970**, 26, 2759.
- [82] U. Rauen, persönliche Mitteilung, **2006**.
- [83] I. Lehnen-Beyel, H. de Groot, U. Rauen, , *Biochem. J.* **2002**, 368, 517.
- [84] U. Rauen, T. Li, R. Sustmann, H. de Groot, , *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, 37, 1369.
- [85] L. A. Poirier, J. A. Miller, E. C. Miller, , *Cancer Research* **1963**, 23, 780.
- [86] J. Houben, T. Weyl, , *Nitrone, allgemeine Arbeitsvorschrift, Vol. E14/2*, **1974**.
- [87] R. W. Murray, K. Iyanar, J. Chen, J. T. Wearing, , *J. Org. Chem.* **1996**, 61(23), 8099.
- [88] W. V. Farrar, , *J. Chem. Soc.* **1965**, 799.
- [89] V. Becker, *Liebigs Annalen der Chemie* **1937**, 531, 108.
- [90] V. A. Azov, F. Diederich, *Helvetica Chimica Acta* **2003**, 86, 3648.
- [91] H. de Groot, M. Brecht, , *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **1991**, 372, 35.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Diana Kobus
Anschrift	Auf dem Gericht 1a, 44894 Bochum
Geburtsdatum und –ort	17. 02.1976 in Bochum/NRW
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

08/1982 – 07/1986	Besuch der Grundschule Hohe-Eiche in Bochum.
08/1986 – 06/1995	Besuch der Erich Kästner-Schule in Bochum.
06/1995	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife.
10/1995-02/1996	Studium Mathematik/Diplom, Ruhr-Universität Bochum.
03/1996 – 08/1996	Praktikum/Aushilfstätigkeit in den Abteilungen Materialwirtschaft, Verwaltung/Rechnungswesen und Vertrieb der G+H Gruppe in Bochum.
09/1996 – 06/1999	Ausbildung zur Chemielaborantin an der Universität-GH Essen.
06/1999	Berufsabschluss Chemielaborantin mit Auszeichnung vor der Industrie- und Handelskammer zu Essen.
10/1999-02/2004	Studium Chemie/Diplom, Universität Duisburg-Essen.
09/2001	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
08/2003	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
09/2003 – 02/2004	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann, Thema: Synthese eines Katalasemimetikums und Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität.
04/2004-12/2006	Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Organische Chemie (Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann) der Universität Duisburg-Essen und am Institut für Physiologische Chemie (Prof. Dr. Dr. H. de Groot) des Universitätsklinikums Essen, Thema: Radikalsonden zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in vitalen Zellen.